



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**“REACTIVOS FIJADORES PARA USO COMÚN EN EL
PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO Y OTRAS APLICACIONES
BIOLÓGICAS (INVESTIGACIÓN DOCUMENTAL)”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

PRESENTA:

ARIADNA FRIAS GARIBAY

ASESOR:

DR. MIGUEL ANGEL CORNEJO CORTÉS

COASESORA:

MVZ OLIVIA ADAMS VÁZQUEZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos **La Tesis:**

“REACTIVOS FIJADORES PARA USO COMUN EN EL PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO Y OTRAS APLICACIONES BIOLÓGICAS (INVESTIGACIÓN DOCUMENTAL)”.

Que presenta el pasante: **ARIADNA FRIAS GARIBAY**
Con número de cuenta: **40704623-4** para obtener el Título de: **Médica Veterinaria Zootecnista**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente; otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 28 de Junio de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRÉSIDENTE	Dr. Carlos Ignacio Soto Zárate	
VOCAL	Dr. Miguel Angel Cornejo Cortés	
SECRETARIO	M.C. Ignacio Carlos Rangel Rodríguez	
1er SUPLENTE	MVZ. Hugo César López Farias	
2do SUPLENTE	Dra. María Leonor Quintero Mora	

NOTA: Los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).
En caso de que algún miembro del jurado no pueda asistir al examen profesional deberá dar aviso por anticipado al departamento.
(Art 127 REP)

HHA/pm

DEDICATORIA

A mi **Mamá** y **Papá** por quererme, apoyarme, enseñarme a ser perseverante y ver las cosas bellas de la vida, los quiero mucho y gracias por todo.

A mi hermano **Adalberto (Toven)** por ese gran lazo de hermandad que nos une y por compartir muchas cosas en este camino que se llama vida, te quiero mucho.

A mi **Tía Gela** por siempre apoyarme y quererme, de igual manera le agradezco a su esposo mi **Tío Felipe**.

A mis primos **Gela** y **Felipe** por ser parte muy importante de mi vida, en la cual hemos compartido muchas cosas y que nos hace tener unos lazos muy fuertes.

A **Rogelio Ibarra** por siempre estar pendiente de mí y ser un tío para mí.

Al **Dr. Miguel Ángel Cornejo Cortes** por darme la oportunidad de trabajar con él y darme su apoyo en mi formación como Médico Veterinario Zootecnista.

De igual manera a la **MVZ Olivia Adams Vázquez** y a **MVZ Hugo César López Farias**.

A todos mis amigos, que gracias a todo lo que he vivido con cada uno de ellos he aprendido muchas cosas y que nunca olvidare.

También a quienes que ya no están conmigo pedirles que me sigan cuidando como los ángeles que ya son.

ÍNDICE	PÁGINA
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	7
MARCO TEÓRICO	8
JUSTIFICACIÓN	11
OBJETIVOS	
OBJETIVO GENERAL	12
OBJETIVOS PARTICULARES	12
METODOLOGÍA	13
RESULTADOS	14
I. FIJADORES SIMPLES	14
FORMOL	15
TETRAÓXIDO DE OSMIO	19
GLUTARALDEHÍDO	22
CLORURO DE MERCURIO	24
ACETONA	25
ETANOL	27
ÁCIDO ACÉTICO	29
ÁCIDO PÍCRICO	32
II. FIJADORES COMPUESTOS	34
BOUIN	35
CARNOY	37
FLEMMING	39
FIJADORES MERCURIALES	41
ZENKER	43
HELLY'S	45
SHAUDINN'S	47
FIJADORES DE CROMATO	48
LIQUÍDO DE MÓLLER	50

SOLUCIÓN DE ORTH	51
III. FIJADORES DE RECIENTE CREACIÓN	52
METHACARN	52
FineFIX	55
HOPE	57
RCL2	59
ANALISIS DE RESULTADOS	61
Tabla 1 REACTIVOS FIJADORES SIMPLES	64
Tabla 2 FIJADORES COMPUESTOS (MEZCLAS)	66
Tabla 3.FIJADORES DE RECIENTE CREACIÓN.	68
CONCLUSIONES	69
BIBLIOGRAFÍA	70
CIBERGRAFÍA	72

RESUMEN

El desarrollo y uso de los reactivos fijadores para tejidos, se incrementó a principios del siglo XX, con fines de preservar las muestras que serían procesadas “histológicamente” mediante infiltración de parafina (o resina) y con fines de realizar estudios histológicos o histopatológicos; así los reactivos fijadores desarrollados en esa época se apreciaban básicamente por la calidad de la conservación morfológica en las muestras.

Dentro de estos reactivos fijadores tenemos: Formol, etanol, glutaraldehído, acetona, ácido acético, ácido pícrico, cloruro de mercurio y mezclas fijadoras como Bouin, Carnoy, Zenker, Helly's, Shaudinn, Möller, Orth, entre otros. Existen algunos reactivos fijadores como el formol, acetona, glutaraldehído, los cuales también permiten la aplicación de técnicas histoquímicas o inmunohistoquímicas.

También en el siglo XX se desarrollaron fijadores que permiten que los tejidos sean estudiados y observados a través del microscopio electrónico tal es caso del: tetraóxido de osmio, etanol y el glutaraldehído. Sin embargo, estos reactivos fijadores, no permiten la aplicación de técnicas de biología molecular como es el caso del PCR, aislamiento y clonación de fragmentos de DNA y RNA e hibridación *in situ*, entre otras.

A finales del siglo XX y principios del siglo XXI, surgen los “nuevos reactivos fijadores”, que permiten estudios histológicos, aplicación de técnicas histológicas (histoquímica, inmunohistoquímica, etc.) y aplicación de técnicas de biología celular y molecular.

La finalidad de este trabajo fue investigar de manera documental los nuevos reactivos fijadores que permiten todo lo anterior, mencionando sus características, usos, ventajas y desventajas.

INTRODUCCIÓN

En el año de 1683, Leeuwenhoek observa células procariontes por primera vez, este es uno de los momentos más interesantes de la ciencia y la medicina, porque a partir de ahí se desarrolla una gran cantidad de experimentos e investigaciones diseñados para poder estudiar y describir a las células y demás estructuras que conforman a los individuos. Estos hechos ocasionaron la necesidad de desarrollar técnicas y utilizar sustancias químicas para conservar a las células y los tejidos lo más parecido posible a su estructura *in vivo*, además de tener otras características como evitar putrefacción, autólisis y deformaciones entre otras cosas (Alberts *et al*, 2008, Garthner *et al*. 2002).

Durante el siglo XX se perfeccionaron técnicas como el procesamiento histológico en donde las muestras de tejidos después de ser fijadas, eran sometidas a una infiltración de parafina o de resina para obtener rebanadas de tejidos que al ser coloradas eran observadas mediante microscopía, con lo anterior se empezó a definir la estructura de los tejidos y las alteraciones patológicas que en ellos se presentaban durante las enfermedades. Así también se desarrollaron técnicas de fijación para preservar las muestras de tejidos, mejorando las condiciones y así proporcionar una mejor observación de tejidos sanos con fines didácticos y de investigación, así como tejidos afectados por enfermedades, los cuales permitieron el desarrollo de técnicas de diagnóstico cada vez más efectivas. (Alzola, 2001).

Hoy en día, el reto es mayor, ya que existen una gran cantidad de aplicaciones en donde se utilizan las biopsias o muestras de tejidos, para fines de diagnóstico o de investigación y esto sigue en aumento, al tiempo que se desarrollan y perfeccionan más técnicas. (Aimale M.A. y Gatti Chr. J., 2004).

Por lo anterior, se requiere el desarrollo de técnicas de fijación novedosas que permitan obtener tejidos, células y sus elementos químicos en condiciones óptimas que permitan la aplicación de las nuevas técnicas histológicas y/o moleculares.

MARCO TEÓRICO

Dentro de las técnicas más utilizadas para el estudio de células y tejidos, se encuentra el procesamiento histológico el cual es muy empleado para estudios de la histología normal y diagnósticos histopatológicos incluyendo los diagnósticos rápidos a partir de biopsias de tejidos. (Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2008)

El procesamiento histológico comienza con la obtención del tejido que será el “objeto de estudio”. En el caso de los tejidos animales tenemos dos opciones para obtener la “muestra” de tejido a estudiar: a) Colectar una porción de un tejido u órgano; b) Procesar el animal completo. (Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2008)

En cualquiera de los casos anteriores, las muestras deben ser sometidas a un proceso de “fijación” que ayude a evitar autólisis y putrefacción, al tiempo que mantiene su integridad estructural, así para lograr una fijación, las muestras son colocadas en soluciones químicas denominadas “Fijadores”, los cuales preservan la integridad de las estructuras celulares y tisulares durante el resto del procesamiento histológico. También se pueden utilizar métodos físicos como aplicar “aire seco” o una “congelación” la cual también proporciona una estructura adecuada de las moléculas de las células y tejidos (Azazola *et al.* 2001; Bancroft *et al.* 2008; Mora *et al.* 2010).

La fijación química es la más utilizada en las muestras histológicas, con el fin principal de detener la *autólisis postmortem* y la putrefacción, ya que éstas son las causas principales de las modificaciones drásticas que experimentan las células al morir. (Banks, 1996, Estrada *et al.* 1982, Azazola *et al.* 2001; Bancroft *et al.* 2008). Para prevenir la autólisis, se tiene que evitar la acción de las enzimas celulares, ya que cuando cesa la actividad de la célula, las enzimas en vez de colaborar en el proceso de síntesis protoplasmática actúan de manera inversa, ocasionando lisis en las estructuras celulares lo cual se conoce como *autólisis postmortem*. Por otro lado, también se debe evitar el crecimiento de bacterias porque ocasionan putrefacción, es decir destruyen los tejidos. (Banks, 1996, Estrada *et al.* 1982, Alzola *et al.* 2001; Bancroft *et al.* 2008).

Los métodos de fijación actúan como si se tomara una “fotografía del tejido” que se mantendrá hasta su observación; así los propósitos de una fijación adecuada son: a) preservar los elementos químicos de la célula, evitando distorsiones y alteraciones en su estructura, b) preservar la morfología lo más parecido a cuando el animal estaba vivo y c) evitar el crecimiento bacteriano para que los tejidos y células no se vean afectados por la putrefacción. (Arun *et al.* 1980; Estrada *et al.* 1982, Banks, 1996, Alzola *et al.* 2001; Bancroft *et al.* 2008)

Sin embargo, la manera de actuar de los fijadores sobre los componentes tisulares, es muy variable y depende de cada fijador en particular y aunque algunos de ellos tienen efectos similares, no todos los fijadores o métodos de fijación tienen las mismas ventajas, ya que a veces se pueden afectar algunas características tisulares que queremos observar y por lo tanto tenemos que recurrir a una fijación muy particular, por ejemplo si queremos observar lípidos no podemos utilizar químicos como los alcoholes porque se destruyen los lípidos (Estrada *et al.* 1982; Alzola 2000; Bancroft *et al.* 2008; Mora *et al.* 2010).

Después de la fijación se procede a incluir el tejido en parafina o resina, se corta en rebanadas delgadas (micrótopo), se tiñe, se agrega un reactivo conservador tipo resina y se puede observar al microscopio (Estrada *et al.* 1982; Alzola 2000; Bancroft *et al.* 2008; Mora *et al.* 2010).

Es muy importante resaltar que “si existe un daño al tejido” ocasionado por una mala fijación, el daño no se podrá revertir y en algunos casos se tendrá que volver a coleccionar la muestra, lo cual no siempre se puede lograr. (Estrada *et al.* 1982; Alzola 2000; Bancroft *et al.* 2008; Mora *et al.* 2010; Martínez *et al.* 2008)

Lo anterior implica que antes de tomar una muestra o biopsia, se debe pensar en el estudio o fin que tendrá para poder elegir el reactivo fijador más indicado; y para esto se requiere conocer de manera veraz y detallada toda la gama de reactivos fijadores que a la fecha se han desarrollado, así como sus ventajas y desventajas, con el fin de poder optimizar sus aplicaciones en las ciencias médicas y biológicas (Estrada *et al.* 1982; Alzola 2000; Bancroft *et al.* 2008; Mora *et al.* 2010; Cui 2011).

Existen fijadores muy conocidos que de manera tradicional se han utilizado para el procesamiento histológico entre los cuales se puede mencionar el **Formol (formalina) buferado (5-10%)** que consiste en una solución de Formaldehído (37% peso sobre volumen) en concentraciones del 5 al 10% en una solución buferada de fosfatos a pH cercano a 7.0 (6.8-7.2), con una temperatura de 25°C. Este fijador a nivel molecular actúa ocasionando enlaces covalentes cruzados en las proteínas celulares y tisulares, lo que permite mantener una estructura estable. El formol buferado es el fijador más conocido y probablemente el más utilizado. En la utilización para procesamiento histológico tiene ventajas como lograr una fijación a las 24 horas y desventajas como no poder utilizar las muestras de manera directa cuando se van a colorear con una tinción tricrómica; así el formol buferado, minimiza la pérdida de componentes celulares como proteínas, péptidos y lípidos evitando la destrucción de las estructuras macromoleculares y organelos como retículo endoplásmico, membranas nucleares, lisosomas y mitocondrias. Hablando de otros usos, como el caso de la biología molecular induce cambios y fragmentación en la estructura del ácido ribonucleico (RNA) y desoxirribonucleico (DNA), desventajas que limitan su uso para biología molecular, ya que en muestras fijadas con formol buferado no se puedan realizar diagnósticos moleculares como en el caso de un diagnóstico mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa Reversa (PCR) (Estrada *et al.* 1982; Alzola 2000; Bancroft *et al.* 2008; Mora *et al.* 2010; Cui 2011).

Por esta razón para realizar un diagnóstico molecular, comúnmente se utilizan muestras frescas o congeladas de tejidos, las cuales permiten obtener RNA o DNA de excelente calidad pero con la desventaja de que no proporcionan una “morfología celular adecuada” que pueda ser útil con fines de diagnóstico histopatológico (Delfour *et al.* 2006; Cui 2011,).

Hoy en día, el estudio citológico se ha ampliado incluyendo y asociando las diferentes disciplinas de la ciencia biológica, por lo que se han realizado investigaciones para desarrollar un reactivo común para diagnósticos histopatológicos y moleculares, por ejemplo se han probado reactivos fijadores como el **Methacarn**, **FineFIX**, **HOPE** y **RCL2**, los cuales permiten una fijación

adecuada en la muestra de tejido, a partir de la cual se pueden realizar estudios histológicos, inmunohistoquímica, hibridación *in situ*, extracción de RNA, DNA, así como PCR, y PCR en tiempo real. Estos son ejemplos de reactivos novedosos que logran una fijación adecuada, permitiendo diagnósticos histopatológicos y moleculares (Morales *et al.* 2002, Shibutani *et al.* 2000, Uneyama *et al.* 2002; Delfour *et al.* 2006).

JUSTIFICACIÓN

El interés de realizar esta investigación documental se debe a que dentro de la Medicina Veterinaria y la gran mayoría de las Ciencias Biológicas, el reactivo fijador más conocido y utilizado es el formol buferado (10%), el cual presenta desventajas; mientras que existen reactivos con desarrollo novedoso, que pueden utilizarse para obtener diagnósticos histopatológicos y moleculares, pero que desafortunadamente son poco conocidos o completamente desconocidos.

Por tal motivo es indispensable contar con una investigación documental que sea actualizada, profunda y analizada, para proponer de manera concreta los usos y aplicaciones de los novedosos reactivos fijadores en la Medicina Veterinaria y Ciencias Biológicas relacionadas.

OBJETIVOS

Objetivo general: Realizar una investigación documental sobre los reactivos fijadores que actualmente se pueden utilizar para el procesamiento histológico y otros usos biológicos como las técnicas de inmunohistoquímica y biología molecular.

Objetivos particulares:

1. Investigar cuáles son los principales reactivos fijadores que se pueden utilizar para el procesamiento histológico y para otros usos biológicos como inmunohistoquímica, aislamiento de DNA, RNA, entre otros.
2. Describir las características principales de cada uno de los reactivos fijadores.
3. Describir sus usos y aplicaciones en el procesamiento histológico, diagnóstico y biológico.
4. Describir las ventajas y desventajas de cada uno de los reactivos fijadores.
5. Proponer de manera concreta los usos y aplicaciones de los reactivos fijadores en la Medicina Veterinaria y las Ciencias Biológicas.

METODOLOGÍA

El presente estudio se basó en una investigación documental, fundamentada en el método científico y en la búsqueda de información relevante. Considerando que el método científico es una sucesión de pasos ligados entre sí, se establecieron las fases con un orden lógico, concretando la siguiente metodología:

1. Selección del tema.
2. Planeación del trabajo.
3. Acopio de información.
4. Análisis.
5. Establecimiento de resultados.
6. Redacción de la tesis.

Durante la fase de acopio de información se utilizaron las siguientes fuentes de información:

1. Bases de datos.
2. Revistas especializadas.
3. Memorias de congresos.
4. Tesis.
5. Libros.
6. Internet.

RESULTADOS

Los resultados de esta investigación documental se han dividido en tres partes:

- I. Fijadores Simples.**
- II. Fijadores Compuestos (mezclas).**
- III. Fijadores de Reciente Creación.**

La información de obtenida para cada uno de los reactivos fijadores se sintetizó y clasificó en 4 rubros:

- **Características**
- **Usos**
- **Ventajas y**
- **Desventajas**

I. FIJADORES SIMPLES

Son reactivos que han sido utilizados mediante soluciones, pero sin mezclarse con otros reactivos, su empleo presenta ventajas y desventajas, lo cual los limita y no les permite ser utilizados como reactivos “universales” de fijación, a pesar de que en la práctica diaria son muy empleados, como en el caso del formol.

Entre los más utilizados tenemos:

- Formol
- Tetraóxido de Osmio
- Glutaraldehído
- Cloruro de Mercurio
- Acetona
- Etanol
- Ácido Acético
- Ácido Pícrico

FORMOL

Características: Su composición química es $H_2C=O$, lo cual corresponde a un grupo carbonilo que va unido a un átomo de hidrogeno y a un grupo alquilo, que es la solución incolora de olor purgante a formol. Tiene gran solubilidad, ya que es miscible en agua en todas las proporciones. Su masa molecular relativa es de 30.30 gr. Y como gas es de 1.04. Tiene sinónimos como, Metanal, Aldehído fórmico, Formaldehido, Formalina. (Brancoft *et al.* 2008, Cook 2006, Morel *et al.* 2003)

Es un compuesto químico, específicamente un aldehído (el más simple de ellos) es altamente volátil y muy inflamable. Se obtiene por oxidación catalítica del alcohol metílico. A temperatura normal es un gas incoloro de un olor penetrante, muy soluble en agua y en ésteres. El formaldehído por ser gas se prepara en soluciones acuosas al 40 % y se conocen con el nombre de **formol**. El formol es un líquido incoloro de olor penetrante y sofocante; estas soluciones pueden contener alcohol metílico como estabilizante. Puede ser comprimido hasta el estado líquido; su punto de ebullición es $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tiene muchos grupos no-aldehído que se disuelve en agua (400 L gas /L de agua a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$). La solución se degrada lentamente bajo formación de paraformaldehído, el polímero del formol. También puede formarse el trímero cíclico. La oxidación del formol da ácido fórmico y en una segunda etapa agua y dióxido de carbono. (Brancoft *et al.* 2008, Cook 2006, Kiernan 1990, Ojeda 1997)

El mecanismo de acción del formol consiste en reaccionar con las proteínas celulares y ácidos nucleicos (DNA, RNA), estabilizándolos mediante la formación de enlaces covalentes; también modifica los nucleótidos al reaccionar con grupos amino libres. (Morel *et al.* 2003, Kiernan 1990)

La solución de agua con formol forma hidrato de metileno y el metilenglicol que es el primer paso para la fijación. El hidrato de metileno reacciona con las cadenas laterales de varias proteínas para formar grupos reactivos secundarios de hidroximetilo ($-CH_2-OH$). En el caso del formol amortiguado (tamponada o buferado) neutro, ocurre lo anterior con tiempos cortos de fijación (24 horas)

presentándose la formación de *cadena lateral hidroximetilo* como reacción primaria y característica. En el DNA (ADN) desnudo y libre, la formación de enlaces covalentes cruzados (reacciones de reticulación) comienzan a partir de la adenina-timidina, y aumentan cuando se incrementa la temperatura. Las cadenas laterales de los péptidos o proteínas son más reactivas con el hidrato de metileno y por lo tanto tienen mayor afinidad por el formol, formando enlaces covalentes cruzados con aminoácidos como lisina, cisteína, histidina, arginina, tirosina y grupos reactivos con hidroxilo de serina y treonina. (Arun *et al.* 1980, Brancoft *et al.* 2008)

El formol conserva la mayoría de los lípidos, especialmente si la solución fijadora contiene iones de calcio. Las reacciones químicas del formol con lípidos (condiciones normales de fijación), ocurren con los grupos amino como el fosfatidil etanolamina, y es aparentemente reversible mediante el lavado con agua. (Martínez *et al.* 2008)

El formol no reacciona de forma significativa con los carbohidratos, esto permite que todas las mucosustancias comunes puedan demostrarse después de la fijación con formol, aunque pierde cantidades apreciables de glucógeno. (Martínez *et al.* 2008)

Usos: El formol es el fijador más común utilizado, así los tejidos fijados en formol y embebidos en parafina representan la fuente más ampliamente disponible para los estudios histológicos retrospectivos, por lo que de esta manera se archivan en una gran cantidad de departamentos patológicos (Artz *et al.* 2011, Cook 2006)

El formol también se utiliza para la conservación de cadáveres frescos y otras muestras biológicas generalmente en una solución al 5% en agua. (Brancoft *et al.* 2008, Kiernan 1990).

Para estudios de histología e histopatología, generalmente se utiliza una solución neutra amortiguada (tamponada o buferado) del 2 al 10% de formol. (Brancoft *et al.* 2008, Kiernan 1990)

Ventajas: Permite el almacenamiento de muestras biológicas a largo plazo; además tiene una rápida y buena penetración en los tejidos. Lo anterior ha definido al formol como un reactivo fijador universal. (Mathew 1998, Brancoft *et al.* 2008, Kiernan 1990)

Es muy recomendable para las técnicas de inmunohistoquímica. (Brancoft *et al.* 2008)

El vapor de formol puede ser utilizado como un fijador para frotis celulares. (Mathew 1998, Brancoft *et al.* 2008, Kiernan 1990)

Fija los lípidos complejos, por lo que conserva bastante bien las mitocondrias y el aparato de Golgi. (Mathew *et al.* 1998)

Precipita las proteínas entrecruzando con los grupos amino, carboxilo e indol de las proteínas, y produce uniones de Metileno con proteínas y otras moléculas adyacentes, estabilizando la estructura celular mediante las interacciones proteína- proteína. (Kiernan 1990, Martínez *et al.* 2008; Brancoft *et al.* 2008)

Desventajas: A elevada concentración puede provocar lisis de las membranas. (Brancoft *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2008)

La formación de enlaces covalentes cruzados (reticulación de las moléculas proteicas) con el formol es mucho más lento que las reacciones químicas que ocurren con otros agentes fijadores, y en ocasiones requieren de 1 a 2 semanas para la terminación completa a temperatura ambiente. Para efectos de histoquímica, los tejidos son comúnmente fijados de 12 a 24 horas a una temperatura de 4°C, pero muchos métodos no histoquímicos especialmente para sistema nervioso funcionan mejor después de la fijación completa. (Brancoft *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2008)

Periodos muy largos de almacenamiento en el formol dan como resultado soluciones de endurecimiento excesivo, pérdida de sostenibilidad de los núcleos y (con soluciones ácidas) se ven depósitos de color café llamados "pigmentos de formol". Esta es una "hematina" formada por la degradación del ácido de la hemoglobina. La hematina puede ser eliminada por tratamiento de las secciones con una solución alcohólica de ácido pícrico o con cualquiera de una variedad de

agentes oxidantes de álcalis. El “pigmento” no se forma si la solución de formol esta amortiguada (tamponada o buferado) la neutralidad. (Brancoft *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2008)

El formol modifica las bases de ácidos nucleicos reduce o bloquea el apareamiento de bases necesarias para el análisis molecular mediante técnicas de hibridación. También es responsable de enlaces cruzados a otras macromoléculas que reducen el rendimiento del ARN extraído. (Arun *et al.* 1980; Kiernan 1990, Martínez *et al.* 2008; Brancoft *et al.* 2008).

TETRAÓXIDO DE OSMIO

Características: Su fórmula es OsO_4 . El Os (VIII) forma complejos tetraédricos cuando está enlazado a cuatro ligandos. Estas estructuras tetraédricas también son observadas para otros óxidos relacionados electrónicamente como el MnO_4 y CrO_4 . El osmio en OsO_4 tiene un estado de oxidación formal de +8, siendo el más alto estado de oxidación conocido para un metal de transición. El átomo de osmio tiene ocho electrones en la capa electrónica de valencia. Si se asume que dos electrones son donados por cada uno de los cuatro ligandos óxido, la cuenta total de electrones para el complejo es 16, tal como también se observa para las especies isoelectrónicas permanganato y cromato. (Tetraóxido de Osmio. URL:http://es.wikipedia.org/wiki/Tetr%C3%B3xido_de_osmio; Bancroft, 2008)

El OsO_4 es formado lentamente cuando el polvo de osmio reacciona con O_2 a temperatura ambiente. La reacción de grandes cantidades de sólido requiere calentamiento a $400\text{ }^\circ\text{C}$. El tetraóxido de osmio existe como un sólido cristalino color amarillo pálido a café (simetría cristalina monocíclica) con un característico olor acre parecido al cloro. El nombre del elemento se deriva del griego *osme*, para *olor*. El OsO_4 es volátil: se sublima a temperatura ambiente. Es soluble en un amplio rango de disolventes orgánicos y moderadamente solubles en agua, con la cual reacciona reversiblemente para formar ácido ósmico. (Tetraóxido de Osmio. URL:http://es.wikipedia.org/wiki/Tetr%C3%B3xido_de_osmio)

El tetraóxido de osmio *puro* es aparentemente incoloro y se ha sugerido que su color amarillo es debido a impurezas de dióxido de osmio (OsO_2). La molécula de tetraóxido de osmio es tetraédrica y por lo tanto es no-polar. Esta no-polaridad ayuda al OsO_4 a penetrar las membranas celulares cargadas. El OsO_4 es 518 veces más soluble en CCl_4 que en agua. (Tetraóxido de Osmio. URL:http://es.wikipedia.org/wiki/Tetr%C3%B3xido_de_osmio)

Es un sólido tóxico, volátil, y soluble en agua. Los sitios de acción incluyen los grupos químicos disulfuro, sulfhidrilo, fenólico, hidroxilo, carboxilo, amida y grupos heterocíclicos. Se sabe que también interactúa con los ácidos nucleicos, especialmente con 2,3 glicol en el resto en grupos de ribosa terminales y los

dobles enlaces 5,6 de los residuos de timina. (Tetraóxido de Osmio. URL:http://es.wikipedia.org/wiki/Tetr%C3%B3xido_de_osmio)

La reacción más caracterizada con el OsO_4 es su reacción con enlaces no saturados de lípidos y fosfolípidos. En esta reacción el OsO_4 en su estado de valencia 8 se convierte en estado de valencia 6, que es incolora. (Tetraóxido de Osmio. URL:http://es.wikipedia.org/wiki/Tetr%C3%B3xido_de_osmio)

Usos: Se utiliza en microscopía electrónica de transmisión (MET) para proporcionar contraste a la imagen.

También es utilizado para contrastar lípidos. (Tetraóxido de Osmio. URL:http://es.wikipedia.org/wiki/Tetr%C3%B3xido_de_osmio; Bancroft, 2008)

En la microscopía electrónica de barrido (MEB) sirve como alternativa al recubrimiento con metales. En la tinción de la membrana plasmática, el tetraóxido de osmio enlaza regiones de la cabeza de los fosfolípidos, creando así un contraste con el citoplasma. Adicionalmente, el tetraóxido de osmio es usado también para fijar muestras biológicas en conjunción con HgCl_2 . (Tetraóxido de Osmio. URL:http://es.wikipedia.org/wiki/Tetr%C3%B3xido_de_osmio; Bancroft, 2008)

Sus rápidas habilidades mortales son usadas para matar rápidamente especímenes como protozoarios. (Tetraóxido de Osmio. URL:http://es.wikipedia.org/wiki/Tetr%C3%B3xido_de_osmio)

El tetróxido de osmio es también usado para teñir lípidos en microscopía óptica.

Ventajas: El OsO_4 es un agente de tinción ampliamente usado en microscopía electrónica de transmisión (MET) y microscopía electrónica de barrido (MEB) como alternativa al recubrimiento con metales. También el OsO_4 estabiliza muchas proteínas transformándolas en geles sin destruir características estructurales. (Tetraóxido de Osmio. URL:http://es.wikipedia.org/wiki/Tetr%C3%B3xido_de_osmio)

Las proteínas de tejidos que son estabilizadas por el OsO_4 no son coaguladas por alcoholes durante la deshidratación. (Tetraóxido de Osmio. URL:http://es.wikipedia.org/wiki/Tetr%C3%B3xido_de_osmio)

Desventajas: El OsO_4 Es altamente venenoso, incluso a bajos niveles de exposición, y debe ser manejado con las precauciones apropiadas. (Tetraóxido de Osmio. URL:http://es.wikipedia.org/wiki/Tetr%C3%B3xido_de_osmio; Bancroft, 2008

El OsO_4 puede teñir la córnea humana, y puede llevar a la ceguera si no se observan las adecuadas precauciones de seguridad. El límite de exposición permisible para el tetróxido de osmio (en un tiempo de 8 horas para una persona con un peso promedio) es de $2 \mu\text{g}/\text{m}^3$. (Tetraóxido de Osmio. URL:http://es.wikipedia.org/wiki/Tetr%C3%B3xido_de_osmio; Bancroft, 2008)

El tetróxido de osmio puede penetrar plásticos y por tanto debe ser almacenado en vidrio en un lugar frío. (Tetraóxido de Osmio. URL:http://es.wikipedia.org/wiki/Tetr%C3%B3xido_de_osmio)

Los núcleos fijados con Osmio y deshidratados con alcohol pueden mostrar aglutinación prominente del ADN. Este *artefacto* se puede prevenir mediante la prefijación con permanganato de potasio y la post-fijación con acetato de uranilo o mediante la adición de iones calcio y triptófano durante la fijación. (Tetraóxido de Osmio. URL:http://es.wikipedia.org/wiki/Tetr%C3%B3xido_de_osmio)

La fijación de tetróxido de osmio causa inflamación del tejido que se invierte durante las etapas de la deshidratación; esto puede minimizarse mediante la adición de cloruro de calcio o sodio para fijadores que contiene osmio. (Tetraóxido de Osmio. URL:http://es.wikipedia.org/wiki/Tetr%C3%B3xido_de_osmio)

GLUTARALDEHIDO

Características: Es un reactivo del grupo de los aldehídos, su fórmula química es $C_5H_8O_2$. Presenta sinónimos como Glutaral, aldehído glutárico, ácido dialdehído-glutárico. Entre sus propiedades físicas tenemos que el glutaraldehído es un líquido oleaginoso sin color o ligeramente amarillento y con un olor acre. Es un compuesto estable sin riesgo de polimerización. (Bancroft *et al.* 2008)

El glutaraldehído en soluciones acuosas polimeriza formando compuestos cíclicos y oligoméricos, también oxida a ácido glutárico. Para ayudar en la estabilidad química, se requiere un almacenamiento a 4°C y pH alrededor de 5. El glutaraldehído tiene un grupo aldehído en ambos extremos de la molécula. (Bancroft *et al.* 2008)

El glutaraldehído tiene un modo de acción que consiste en la formación de polímeros de cadena larga, proporcionando un alto grado de conservación de la estructura del tejido. En consecuencia, los tejidos fijados con glutaraldehído están llenos de grupos aldehído artificialmente introducidos, que muchos reaccionan con histoquímica, entre los grupos que reaccionan se mencionan los aminoácidos que forman intermediarios de piridina. (Kiernan 1990, Morel *et al.* 2003)

Usos: Se usa como un agente fijador de tejidos en los laboratorios de histología y patología. (Kiernan 1990; Morel *et al.* 2003)

Es muy empleado en microscopía electrónica. (Morel *et al.* 2003)

En cuanto a la temperatura a la que debe usarse el glutaraldehído debemos jugar con dos parámetros opuestos:

- El incremento de la temperatura facilita la reacción entre el glutaraldehído y las moléculas de los tejidos, acelerando su penetración. (Kiernan 1990; Morel *et al.* 2003)
- La disminución de la temperatura minimiza la extracción de los constituyentes celulares al disminuir la autólisis. (Ojeda 1997)

Por lo anterior, en la fijación rutinaria lo más frecuente es utilizarlo entre 0 y 4°C. Una alternativa es fijar en un primer tiempo en frío y en un segundo tiempo a

temperatura ambiente, lo que es especialmente aconsejable para la fijación de muestras grandes de inmersión. (Ojeda 1997; Kiernan 1990; Morel *et al.* 2003))

Ventajas: Funciona con rapidez, el glutaraldehído al 1% de proteínas y péptidos hace las correcciones en 10 segundos y en los aminoácidos libres en 1 minuto. La concentración más baja que tiene un efecto fijador es 0.025%. (Morel *et al.* 2003)
Las muestras pueden dejarse en el glutaraldehído durante muchas horas sin que se deterioren, además no desnaturaliza las proteínas por lo que los tejidos conservan en buen grado su antigencidad, lo que es útil para realizar técnicas inmunocitoquímicas. (Ojeda 1997)

Desventajas: La penetración del glutaraldehído es relativamente lenta. (Kiernan 1990; Morel *et al.* 2003)

Se conserva durante largo tiempo a 4°C. El mayor problema del glutaraldehído es que, por conservación muy larga o por otras circunstancias, se polimeriza excesivamente, ya polimerizado puede ocasionar “artefactos de fijación”. (Kiernan 1990; Morel *et al.* 2003)

Los enlaces cruzados, que hacen que los ácidos nucleicos sean menos accesibles, no son reducibles. Los enlaces cruzados reducen considerablemente la penetrabilidad del tejido, incluso después de la digestión proteica intensa. (Morel *et al.* 2003)

Entre los elementos que nos permiten detectar que un glutaraldehído está excesivamente polimerizado se tiene:

- La solución presenta un color amarillento.
- El pH es inferior a 3. (Ojeda 1997; Morel *et al.*, 2003)

COLORURO DE MERCURIO

Características: Su fórmula química es HgCl_2 . Se presenta como cristales blancos o polvo, es inodoro. Soluble en varios líquidos como agua, alcohol, éter, glicerol y ácido acético. No se conocen sinónimos. Su modo de acción no se conoce muy bien, sin embargo, se sabe que el cloruro de mercurio reacciona con sales de amonio, aminas, amidas, aminoácidos y los grupos sulfhidrilo y endurece los tejidos. Es especialmente reactivo con la cisteína formando un dimercaptide y la acidificación de la solución. (Kiernan 1990, Bancroft *et al.* 2008)

Usos: Se utiliza en las denominadas mezclas mercuriales, en donde se combina con otros elementos. (Mathew *et al.* 1998)

Ventajas: Posee gran velocidad de penetración y precipita todas las proteínas. (Cook 2006)

Desventajas: Los fijadores a base mercurio son tóxicos y deben manejarse con cuidado. No debe permitirse que entren en contacto con el metal y debe ser disuelto en agua destilada para evitar la precipitación de sales de mercurio. (Cook 2006).

Endurece mucho a los tejidos además, los fijadores de mercurio penetran lentamente a la muestra por eso debe ser una muestra delgada, el mercurio y el formaldehido pueden formar depósitos de hemateína en el tejido después de la fijación. (Cook 2006)

Los productos que contienen mercurio son un problema de eliminación, por la contaminación que ocasionan al medio ambiente. (Cook 2006; Bancroft, 2008).

Fijadores de mercurio ya no se utilizan habitualmente, excepto por algunos laboratorios para la fijación de los tejidos hematopoyéticos. (Ojeda 1997; Bancroft, 2008).

ACETONA

Características: Su fórmula es $\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$, es una cetona alifática, contiene un átomo de hidrogeno enlazado con un átomo de carbono vecino a un doble enlace $\text{C}=\text{O}$. Es miscible en todas las proporciones con agua y con disolventes orgánicos tales como éter, metanol, alcohol etílico y ésteres. Es incompatible con oxidantes y reactivos y ácidos. Es un agente no aditivo y muy oxidante (0.65 volt.), debido a que el átomo de oxígeno puede compartir coordinadamente un par de electrones. Se presenta como un líquido incoloro. Es un buen disolvente de acetato de celulosa y para muchos compuestos orgánicos. Tiene sinónimos como 2-Propanona, Dimetil Cetona, Metil Cetona; Ácido Piroacético. (Lillie *et al.* 1976, McMurry 2001, Hoja de seguridad Acetona. URL:<http://www.quimica.unam.mx/IMG/pdf/4acetona.pdf>)

El mecanismo de acción de la acetona consiste en disolver los lípidos y los carbohidratos los cuales quedan conservados debido a la correcta precipitación de las proteínas. Sin embargo, la rápida extracción del agua desde el tejido provoca una contracción nuclear, que deja un halo perinuclear, esto especialmente en los epitelios. (Lillie *et al.* 1976; Bancroft *et al.*, 2008).

Usos: La acetona se usa como un fijador rápido para el tejido cerebral en el diagnóstico de la rabia y durante un tiempo fue el fijador de elección para la preservación de las fosfatasas y lipasas. (Arun *et al.* 1980; Bancroft *et al.*, 2008; McMurry 2001, Hoja de seguridad Acetona. URL:<http://www.quimica.unam.mx/IMG/pdf/4acetona.pdf>)

La acetona ha llegado recientemente como solvente para ciertas sales metálicas, para su uso a bajas temperaturas en sustitución de las técnicas de congelación para los bloques de tejido. (Lillie *et al.* 1976; Bancroft *et al.*, 2008).

Generalmente se emplea sola. Es recomendada para ácidos nucleicos y en protocolos de inmunofluorescencia directa para la detección de complejos autoinmunes (biopsia renal, hepática, piel o mucosa). También se le puede emplear en determinados estudios con microscopio electrónico de transmisión.

(Lillie *et al.* 1976, Bancroft *et al.*, 2008; Fijación de Muestras Histológicas. URL: <http://www.educacionhistotecnologiafijaciondos.blogspot.mx/>)

Ventajas: Debido a que mantiene de forma adecuada la estructura de las proteínas y ácidos nucleicos, se recomienda en protocolos de inmunofluorescencia directa para la detección de complejos autoinmunes (biopsia renal, hepática, piel o mucosa). También se le puede emplear en estudios con microscopio electrónico de transmisión. (Ojeda 1997, Arun *et al.* 1980; Bancroft *et al.*, 2008; Fijación de Muestras Histológicas. URL: <http://www.educacionhistotecnologiafijaciondos.blogspot.mx/>))

Desventajas: Es de rápida acción, con una penetración lenta, ocasionando una fragilidad en el tejido si el uso es prolongado. (Bancroft *et al.* 2008)

La acetona elimina lípidos del tejido durante el procesamiento. (Bancroft *et al.* 2008)

ETANOL

Características: Su composición química es C_2H_6O , esto lo hace ser una sustancia orgánica perteneciente al grupo de los alcoholes de tipo primario. Es miscible en agua en cualquier proporción. Tiene sinónimos como Etanol absoluto, alcohol etílico, alcohol anhidro. Es un líquido claro, incoloro e inflamable. Es hidrófilo, miscible con agua y otros disolventes orgánicos, tiene una acción rápida y fiable. (Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2008)

El mecanismo de acción del etanol es que, su propiedad deshidratante es bien conocida y provoca una desnaturalización irreversible de las proteínas. También precipita los ácidos nucleicos. (Cook 2006; Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2008)

Usos: Las concentraciones graduadas de etanol se utilizan para la deshidratación. Disuelve los lípidos, precipita el glucógeno sin fijarlo y al reaccionar con los nucleoprotidos forma un precipitado hidrosoluble. Es poco penetrante, fija mal los núcleos y poco los citoplasmas. (Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2008)

El etanol asegura la deshidratación total, haciéndolo el reactivo de elección para el procesamiento de las muestras de microscopía electrónica. (Bancroft *et al.* 2008)

Se utiliza ampliamente como un constituyente de los fijadores de cromosomas. El porcentaje adecuado para la fijación varía de 79 a 100 por ciento. (Arun *et al.* 1980; Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2008)

Es un fijador eficaz para la cromatina, se puede utilizar en combinación con ácido acético, formol o cloroformo. (William 2001)

La fijación con etanol frío se utiliza a menudo para la preservación de ciertas enzimas, así los grupos reactivos de enzimas generalmente permanecen inalteradas. Por ello se utiliza con fines citoquímicos, ya que no afecta el punto isoeléctrico, que es una ventaja añadida para estos estudios. (Arun *et al.* 1980; Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2008)

Ventajas: Una de las ventajas más importantes de la utilización de etanol es que la capacidad para la penetración de los tejidos es inmediata. (Arun *et al.* 1980; Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2008)

Desventajas: Ocasiona un efecto de endurecimiento en el tejido. La acción desnaturalizante de proteínas debido a la precipitación, puede convertir la molécula “impermeable” a los reactivos. Rompe los puentes de hidrógeno y enlaces de sal en las cadenas de proteínas, lo que revela varios grupos secundarios. Como altera el patrón de estereoquímica, su efecto debe ser considerado. (Arun *et al.* 1980; Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2008)

Por ser un agente de reducción, se somete a oxidación inmediata en acetaldehído y después en ácido acético en presencia de un oxidante, y esto ocasiona que no se pueda combinar con muchos fijadores metálicos, tales como ácido crómico o tetróxido de osmio. (Arun *et al.* 1980, Alzola 2001; Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2008)

ÁCIDO ACÉTICO

Características: Su fórmula química es CH_3COOH , tiene un átomo de hidrógeno enlazado con un átomo de oxígeno (O-H). Presenta una acidez debida a que la base conjugada resultante de la pérdida de H^+ se estabiliza porque su carga negativa se encuentra en el átomo de oxígeno muy electronegativo. Tiene sinónimos como Ácido acético glacial; Ácido etanoico; Ácido etílico; Ácido metilencarboxílico. El ácido acético, o su forma ionizada, el acetato, es un ácido que se encuentra en el vinagre, y que es el principal responsable de su sabor y olor agrios. Hoy en día, la vía natural de obtención de ácido acético es a través de la carbonilación (reacción con CO) de metanol. Antaño se producía por oxidación de etileno en acetaldehído y posterior oxidación de éste a ácido acético. Es un líquido incoloro que puede tener cristales, con un olor típico a vinagre. (McMurry 2001, Cook 2006; Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2008)

El ácido acético es de gran penetración, la cual es superior incluso a los alcoholes; posiblemente sus iones más pequeños son los responsables de esta propiedad. (Kiernan 1990; Cook 2006; Bancroft *et al.* 2008;)

El ácido acético no fija proteínas, pero sí coagula ácidos nucleicos, aunque este mecanismo no está bien definido. Al igual que la rápida penetración y la producción de inflamación, que es una propiedad del ácido no disociado y no del ion acetato. Estas propiedades son compartidas por otros ácidos carboxílicos que son miscibles con el agua y aceites. El ácido acético se utiliza en mezclas fijadoras para preservar cromosomas, previniendo acciones de acortamiento (encogimiento) que ocasionan reactivos como el etanol y ácido pícrico. (Kiernan 1990; Cook 2006; Bancroft *et al.* 2008)

Usos: No se recomienda utilizarse solo, pues únicamente fija las nucleoproteínas por precipitación, además de que produce “hinchamiento” de los tejidos (especialmente de los conectivos colágenos). Puesto que este efecto contrarresta el defecto de encogimiento de los agentes fijadores como las sales de mercurio,

alcohol, etanol y formol, se añade ácido acético a muchos fijadores compuestos. El ácido acético precipita todas las mucinas, con excepción de las de origen gástrico. (Mathew *et al.* 1998; Cook 2006; Bancroft *et al.* 2008;)

Ventajas: Una de las principales ventajas de usar ácido acético en una mezcla de fijación es que se puede combinar con agua, o con otros fijadores como metanol o etanol. Se puede utilizar en baja concentración. El término “glacial” se deriva del hecho de que se congela de manera semejante al hielo pero con temperaturas extremadamente frías (glaciales). (Arun *et al.* 1980; Mathew *et al.* 1998; Cook 2006; Bancroft *et al.* 2008)

Desventajas: Se ha observado que el ácido acético puede precipitar el DNA y disolver las histonas, pero es incapaz de fijar las proteínas citoplasmáticas. Tampoco es recomendado para la observación de fosfolípidos. El dicromato de potasio, que es un fijador bueno para los lípidos, pierde esta propiedad si se usa en combinación con ácido acético. Baker sugirió que puede precipitar nucleoproteína pero no a la albumina, Wolman señaló que el ácido acético afecta la fijación de proteínas como nucleoproteínas y mucoproteínas. (Arun *et al.* 1980; Cook 2006; Bancroft *et al.* 2008)

El ácido acético es, en general, un fijador ideal para cromosomas, y a pesar de que se ha encontrado que disuelve las histonas, se ha utilizado para mantener la estructura de los cromosomas intactos, presumiblemente porque no produce ninguna distorsión de la nucleoproteína. Una de las limitaciones de este fijador es que puede ocasionar un hinchamiento excesivo de los cromosomas, este punto debe tenerse en cuenta, y así el ácido acético se debe utilizar en combinación con alcoholes, o productos químicos similares, que encogen y endurecen el tejido. Para el estudio de los cromosomas meióticos, donde el propósito es estudiar los detalles estructurales, el ácido acético es muy adecuado, por ejemplo en el análisis de los cromosomas en paquiteno (Profase de Meiosis I) donde los detalles cromosómicos se requieren, el ácido acético sirve como un fijador ideal. (Arun *et al.* 1980; Cook 2006; Bancroft *et al.* 2008)

El ácido acético es también buen disolvente para colorantes de anilina, y debido a esta propiedad, es un componente necesario de las mezclas de tinción, como el caso de carmine-acético o orceína-acético. (Arun *et al.* 1980; Cook 2006; Bancroft *et al.* 2008)

ÁCIDO PÍCRICO

Características: Su composición química es $C_6H_2OH(NO_2)_3$. En base al trinitrofenol tiende a formar sales de picrato que son peligrosas e inestables. Los grupos nitro (fuertemente electronegativos) estabilizan la base conjugada, haciendo que el H del grupo OH se disocie con facilidad, dando entonces una disolución ácida del mismo, de ahí su nombre de "ácido". No tiene sinónimos. (Kiernan 1990; Cook 2006; Bancroft *et al.* 2008)

El ácido pícrico forma cristales incoloros o ligeramente amarillos, de sabor muy amargo. Es insoluble en agua fría pero soluble en agua caliente, éter, etanol, benceno y xilol. (Arun *et al.* 1980, Torres 2002; Cook 2006; Bancroft *et al.* 2008)

El mecanismo de acción del ácido pícrico da una fijación dura, que es excelente para muchos propósitos; se fija con intensidad sobre los citoplasmas, facilita todas las coloraciones. Ocasiona acortamiento (contracción) en los tejidos y endurece un poco. (Arun *et al.* 1980; Kiernan 1990; Torres 2002; Cook 2006)

Usos: Se utiliza en mezclas. Una solución acuosa saturada de ácido pícrico (pH 1.5-2.0), causa coagulación por formación de sales (picratos) con los grupos básicos de las proteínas. La precipitación no se produce en una solución neutra, y neutralizando permite a las proteínas precipitadas el disolverse. Los tejidos fijados en mezclas que contienen ácido pícrico generalmente se transfieren directamente a 70% de alcohol, para coagular las proteínas precipitadas. (Arun *et al.* 1980; Kiernan 1990, Torres 2002; Cook 2006)

Ventajas: Al fijarse con intensidad sobre los citoplasmas, facilita todas las coloraciones. (Arun *et al.* 1980; Torres 2002; Cook 2006)

Desventajas: El ácido pícrico es muy fuerte y provoca hidrólisis de los ácidos nucleicos, de modo que los fijadores que los contienen no permiten que el DNA y el RNA se estudien histoquímicamente. (Kiernan 1990; Torres 2002; Cook 2006).

Los bloques deben permanecer en alcohol de 70% (varios cambios), tanto como sea posible para que el color amarillo se elimine. El contacto prolongado con ácido pícrico, incluso en cera de parafina sólida, pueden causar el deterioro estructural y tinción pobre. (Kiernan 1990; Cook 2006; Bancroft *et al.* 2008)

II. FIJADORES COMPUESTOS (MEZCLAS)

Existen numerosos reactivos que pueden utilizarse solos como agentes fijadores, pero que al mezclarse con otros elementos presentan sinergia, incrementando sus cualidades y atenuando sus defectos. Así, es como se han desarrollado estas “mezclas fijadoras” en donde se combinan un número variable de sustancias químicas. (Cook 2006; Bancroft *et al.* 2008)

Entre las más conocidas tenemos:

- Bouin
- Carnoy
- Flemming
- Fijadores mercuriales
- Zenker
- Helly's
- Shaudinn's
- Fijadores de cromato
- Líquido de Möller
- Solución de Orth

BOUIN

Características: Su composición química está basada en la mezcla de los siguientes elementos:

- Ácido pícrico en solución saturada de agua= 75 ml
- Formol ($H_2C=O$)= 25 ml
- Ácido Acético Glacial (CH_3COOH)= 5 ml, que se agregan al momento de utilizar la mezcla

Considerando que es una mezcla con 3 reactivos químicos, es difícil determinar las propiedades físicas de los reactivos una vez que se mezclan. (Cook 2006; Bancroft *et al.* 2008; Mora *et al.* 2010)

Usos: Para los trabajos comunes de histología es considerada como la mejor “mezcla fijadora”. Es una solución muy utilizada para el procesamiento de tejidos que se incluirán en parafina y a cuyas secciones se les puede aplicar un amplio espectro de tinciones que incluyen las denominadas “tricrómicas”. Es muy útil para tejidos blandos y embriones, preserva bien el núcleo y el glucógeno. Es un excelente fijador en general para el tejido conectivo y conserva el glucógeno. (Graeme *et al.* 1977; Bancroft 2008)

El ácido acético y pícrico causan inflamación de tejidos y no sólo se usan como descalcificadores, pero se encuentran como componentes en el fijador de Bouin. En este fijador actuará de manera incidental, y sería como un descalcificador débil; podría ser utilizado en casos de urgencia, con un mínimo de descalcificación. (Bancroft *et al.* 2008, Graeme *et al.* 1977)

Ventajas: El líquido completo de Bouin constituye una solución estable. Es uno de los mejores fijadores para el estudio del glucógeno. Penetra rápidamente a los tejidos, y es un buen fijador en general, salvo para el riñón. (Mathew *et al.* 1990; Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2008)

Fijar con solución de Bouin da resultados óptimos para técnicas tricrómicas (Martínez *et al.* 2008).

Las piezas pueden ser relativamente voluminosas y tener hasta un centímetro de espesor. Deberán permanecer en el fijador de 24 horas hasta 3 días, siendo ésta la duración óptima para las piezas de mediano volumen, aunque una permanencia de hasta 8 días en el mismo fijador no las perjudica. Después de la fijación las piezas no requieren ser lavadas especialmente. (Mathew *et al.* 1998; Martínez *et al.* 2008)

Desventajas: Destruye las membranas, por lo tanto no se puede recuperar los núcleos intactos; y puede encoger muestras grandes; se recomienda que los tejidos no permanezcan en este líquido por más de 12 a 24 horas, ya que pueden volverse muy duros y quebradizos, lo que podría ocasionar dificultades al hacer los cortes. Los lípidos disminuyen en cantidad, y se modifican, de modo que el tejido se desmorona al hacer cortes por congelación. (Bancroft *et al.* 2008, Mathew *et al.* 1998)

El fijador Bouin no es adecuado, ya que causa el exceso de hidrólisis del ácido nucleico durante la fijación, para el caso de la reacción de Feulgen que es una prueba estándar para demostrar la desoxirribosa. (Bancroft *et al.* 2008)

No está recomendado para el riñón ni para el estudio de mitocondrias. Produce lisis de los glóbulos rojos, y disminuye la cantidad de hierro férrico demostrable a partir de pigmentos sanguíneos. Hacen que el ARN sea relativamente resistente a la digestión de ARNasa. Aquí la inclusión de cloruro de sodio al 6% podría ser juzgado. (Lillie *et al.* 1976 y Mathew *et al.* 1998; Martínez *et al.* 2008)

Antes de la inclusión en parafina es conveniente eliminar el ácido pícrico mediante lavados en alcohol de 70° porque puede hacer que no se produzca una buena inclusión o que las tinciones no sean adecuadas. (Visita guiada por las Técnicas Histológicas. Fijadores. URL: <http://webs.uvigo.es/mmegias/6-tecnicas/2-fijadores.php>)

CARNOY

Características: Su composición química está basada en la mezcla de los siguientes elementos:

- Etanol absoluto (C_2H_6O)= 60ml
- Cloroformo ($CHCl_3$)= 30 ml
- Ácido acético glacial (CH_3CO_2H) = 10ml

Considerando que es una mezcla con 3 reactivos químicos, es difícil determinar las propiedades físicas de los reactivos una vez que se mezclan. (Kiernan 1990; Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2008)

Los mecanismos de acción del fijador de Carnoy consisten en deshidratar, eliminando tanto el agua libre como la ligada, también cambia la estructura terciaria de las proteínas por lo que se precipitan, pero dejan los ácidos nucleicos relativamente sin cambios. (Bancroft *et al.* 2008)

Tiene la propiedad de penetrar rápidamente, lo que coagula ácidos nucleicos y proteínas y extractos de lípidos. Muchos de los componentes con hidratos de carbono también se conservan. Los bloques de hasta 5mm de espesor, se fijan en 6 a 8 horas. La fijación de más de 18 horas puede ocasionar una hidrólisis con pérdida de ácidos nucleicos (RNA). Este efecto puede ser suprimido mediante el uso de 5 ml en lugar de 10 ml de ácido acético. (Kiernan 1990; Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2008)

Usos: Se recomienda como un fijador para muestras que serán analizadas mediante la técnica de Papanicolaou. (Kiernan 1990; Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.*, 2008)

Como un agente fijador para el DNA (nuclear y mitocondrial) en diversos tejidos. (Kiernan 1990; Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2008)

Como un agente fijador para mantener la mucina (moco), lo cual es muy útil para la preparación del tejido antes de la tinción con ácido periódico de Schiff. (Carnoy's Solution. URL: http://en.wikipedia.org/wiki/Carnoy's_solution)

Carnoy también es muy útil para las coloraciones de RNA, como por ejemplo verde de metil-pironina, y para la preservación de glucógeno. (Bancroft *et al.* 2008)

Ventajas: Penetra en tejidos extremadamente rápido, es muy adecuado para pequeños fragmentos tisulares, por ejemplo los obtenidos por raspado, que se fijan bien en 30 minutos a dos horas. También inicia la deshidratación, y es un buen fijador para el glucógeno; da una fijación nuclear excelente, los núcleos se tiñen bien y la definición es buena. Los gránulos de Nissl (retículo endoplásmico rugoso) presentes en el citoplasma de las neuronas también se conservan bien, así como las demás estructuras citoplasmáticas. (Lillie *et al.* 1976 y Mathew *et al.* 1998; Kiernan 1990; Bancroft *et al.* 2008; Martínez et al, 2008)

Desventajas: Puede encoger y endurecer los tejidos, produce hemolisis de glóbulos rojos, encogimiento importante, y sólo conviene para fragmentos tisulares pequeños. Disuelve los lípidos (incluyendo la grasa neutra) y por lo tanto afecta la mielina. Aunque fija bien el glucógeno, produce “polarización”, porque los gránulos de glucógeno migran hacia uno de los polos de las células. Las ultraestructuras se destruyen debido a la extracción de lípidos, y puede causar encogimiento excesivo de los componentes del tejido después de más de 3 a 4 horas de fijación. (Lillie *et al.* 1976 y Mathew *et al.* 1998; Kiernan 1990; Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2008)

FLEMMING

Características: Su composición química está basada en la mezcla de los siguientes elementos:

- Ácido ósmico (OsO_4)= 4ml
- Ácido crómico (H_2CrO_4)= 15 ml
- Ácido acético ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$)= 1 ml

En la mezcla la proporción del ácido acético es variable, de hecho el ácido acético y el ácido crómico, son precipitantes buenos de la cromatina, mientras que el ácido ósmico ayuda a preservar el resto de los elementos celulares. La precipitación de proteínas también es ayudada por el ácido crómico (Lillie *et al.* 1976; Arun *et al.* 1980, Mathew *et al.* 1998; Kiernan 1990; Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.*, 2008).

Usos: Se deben utilizar mezclas recién preparadas, porque después de mezclarse no se conservan bien. Tarda mucho tiempo en penetrar a los tejidos, y se recomienda que las piezas no tengan más de 2 mm de espesor. Es un buen fijador para el trabajo con microscopio electrónico, y también para la mielina de los nervios periféricos. La fijación requiere de 12 a 25 horas, y debe ir seguida por lavado cuidadoso y una conservación en alcohol al 80 %. (Lillie *et al.* 1976; Arun *et al.* 1980, Mathew *et al.* 1998; Kiernan 1990; Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.*, 2008).

Es un buen fijador para estudios histológicos, la presencia de ácido acético ayuda a que el ácido crómico no ocasione una contracción muy severa al tejido. La calidad de corte de este material fijo es también muy satisfactoria. El período de fijación varía entre 4 y 24 horas. Siempre es preferible mantener los tres componentes por separado, y se mezclan justo antes del uso. Si el ácido acético es necesario, el ácido crómico y ósmico se pueden mezclar en las proporciones requeridas y se almacenan, y el ácido acético se debe añadir en el momento de la fijación. Después de fijar, las muestras deben lavarse y mantenerse en alcohol de

70% por 24 horas (Lillie *et al.* 1976; Arun *et al.* 1980, Mathew *et al.* 1998; Kiernan 1990; Bancroft *et al.* 2008; Martínez et al, 2008).

Ventajas: Es un buen fijador para muestras que se observarán con microscopio electrónico, es ampliamente recomendado para la preservación de cromosomas y tinción de cromosomas, así como para la mielina de los nervios periféricos (Lillie *et al.* 1976; Arun *et al.* 1980, Mathew *et al.* 1998; Kiernan 1990; Bancroft *et al.* 2008; Martínez et al, 2008).

Desventajas: No actúa igual en todos los tejidos y estratos celulares. Debido a la precipitación satisfactoria y la presencia de metales pesados, la tinción nuclear es muy intensa, aunque a pesar de esta falta de uniformidad de la fijación, es recomendado para la preservación de cromosomas y detalles nucleares. (Lillie *et al.* 1976; Arun *et al.* 1980, Mathew *et al.* 1998; Kiernan 1990; Bancroft *et al.* 2008; Martínez et al, 2008).

FIJADORES MERCURIALES

Se preparan con la sal de cloruro de mercurio (HgCl_2), y generalmente en solución saturada (5 a 7%) en agua. Los iones de mercurio actúan principalmente en combinación con los grupos ácidos (carboxilo-COOH) de las proteínas y forman combinaciones, especialmente estables, con los radicales de sulfuro. (Lillie *et al.* 1976; Arun *et al.* 1980, Mathew *et al.* 1998; Kiernan 1990; Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2008).

El cloruro de mercurio endurece rápidamente las capas externas de tejidos y penetra poco más de 3 o 4 mm y, en consecuencia, el tejido debe ser cortado en rebanadas que no tengan más de 5 mm de espesor. (Lillie *et al.* 1976; Kiernan 1990; Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2008).

Se caracteriza por endurecer el citoplasma y preserva su afinidad por colorantes básicos de anilina mejor que el formol. (Lillie *et al.* 1976; Kiernan 1990; Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2008).

Las sales de cloruro de mercurio generalmente se utilizan en mezclas, por ejemplo: Zenker, Helly's, Shaudinn's. (Bancroft *et al.* 2008; Lillie *et al.* 1976)

Ventajas: Tienden a mejorar la tinción de los núcleos y el tejido conjuntivo; la tinción tricromática resulta especialmente favorecida. La tinción de citoplasma con colorantes ácidos se acentúa, y se pueden percibir detalles de la cromatina del núcleo. Los fijadores con mercurio dan los mejores resultados con tinción metacromática, y son los fijadores ordinarios de elección para preservar los detalles cuando se quieren hacer fotografías. (Bancroft *et al.* 2008; Lillie *et al.* 1976)

Desventajas: Debido a que su poder de penetración es limitado (3-4 mm), no debe utilizarse solo, por ello es común su empleo mediante mezclas realizadas con ácido acético, cromatos, alcoholes y formaldehído; entre las mezclas más comunes tenemos fijadores como: Zenker, Helly's, Shaudinn's. (Bancroft *et al.* 2008; Lillie *et al.* 1976)

A veces producen ciertas molestias. La solución de cloruro de mercurio corroe todos los metales, salvo la aleación de níquel conocida como Monel. El cloruro de mercurio produce un encogimiento pronunciado. Para contrarrestar este efecto, la mayor parte de líquidos fijadores contienen también ácidos. Todos los fijadores a base de cloruro de mercurio disminuyen la cantidad de glucógeno. Si los tejidos se dejan en estos fijadores por más de uno o dos días, se vuelven muy duros y quebradizos. Los cortes por congelación de tejidos fijados en soluciones mercuriales son extraordinariamente difíciles de practicar. Las soluciones mercuriales provocan en el tejido la formación de gránulos negros difusos, y estos depósitos mercuriales deben ser eliminados antes de la tinción. (Mathew *et al.* 1998; Kiernan 1990; Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2008)

Debido a la afinidad relativamente mayor del citoplasma por los colorantes ácidos, las diferencias de basofilia y oxifilia de regeneración, o de las células maduras y necrosadas son menos demostradas que con el formol. (Lillie *et al.* 1976; Kiernan 1990; Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2008)

Un problema con la fijación en soluciones de mercurio es que varios tipos de pigmento se pueden combinar con el mercurio. Estos pigmentos son retirados de las secciones mediante tratamiento con yodo y después con tiosulfato de sodio. (Bancroft *et al.* 2008)

ZENKER

Características: Es una mezcla compuesta de:

- Agua destilada (H_2O)= 250ml
- Cloruro de Mercurio ($HgCl_2$)= 12.5g
- Dicromato de Potasio ($K_2Cr_2O_7$)= 6.3g
- Sulfato de Sodio (Na_2SO_4)= 2.5g

Su aspecto es de un líquido amarillento de olor inodoro, que presenta solubilidad con agua. (Bancroft *et al.* 2008)

Usos: Se le puede emplear para la preservación de componentes ricos en sangre y para la realización de métodos tricrómicos y coloración de miofilamentos. (Kiernan 1990; Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2008)

El Fijador de Zenker tiene una fijación rápida en los tejidos animales. Se emplea para preparar muestras de tejidos animales o vegetales para su estudio microscópico. Proporciona una excelente fijación de las estructuras nucleares como la cromatina, el tejido conectivo y algunas fibras citoplasmáticas características, sin embargo, no conserva orgánulos citoplasmáticos como las mitocondrias.

(Fijador de Zenker.

URL:http://translate.google.com.mx/translate?hl=es&langpair=en%7Ces&u=http://en.wikipedia.org/wiki/Zenker's_fixative)

A temperatura ambiente los bloques pequeños de 2 a 4 mm de espesor quedan fijados en 2 a 6 horas. Para el caso de otras muestras obtenidas por punción como biopsias de hígado o riñón, sólo se necesitan de 30 a 60 minutos para obtener una buena fijación. La solución de Zenker ya preparada, puede conservarse varios meses sin que sufra alteración. (Mathew *et al.* 1998; Kiernan 1990; Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2008)

Ventajas: Es excelente para el trabajo morfológico donde no se requieren técnicas de histoquímica (Kiernan 1990; Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2008)

Es un buen fijador para los tejidos embrionarios, se consigue fijación con 6 horas, la preservación estructural es buena y se puede mejorar mediante sinergia con una post-fijación durante 7 días con formol. (Kiernan 1990; Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2008)

Desventajas: Antes de emplear las tinciones es necesario eliminar de los tejidos, los pigmentos precipitados del bicloruro de mercurio. (Lynne 2001; Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.*, 2008)

El ácido reacciona con el dicromato y hace que la solución se oscurezca progresivamente, por lo que debe recomponerse antes de su uso. (Lynne 2001; Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.*, 2008)

No es compatible con muchas técnicas de histoquímica. (Lynne 2001; Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.*, 2008)

La solución de Zenker destruye muchos eritrocitos y se elimina gran parte del hierro de hemosiderina. (Lynne 2001; Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.*, 2008)

HELLY'S

Características: Es una mezcla compuesta por:

- Agua destilada= 250 ml
- Cloruro de Mercurio (HgCl_2)= 12.5g
- Dicromato de Potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)= 6.3 g
- Sulfato de Sodio (Na_2SO_4)= 2.5g

Es importante comentar que antes de su uso, se deben añadir 5 ml de formol (37%) por cada 95 ml de la solución de Helly. (Bancroft *et al.* 2008)

Los componentes no-coagulantes como el formol y el Dicromato compensan la acción coagulante del cloruro de mercurio, de manera que el citoplasma no queda coagulado. La mezcla se pone color verde y turbio, debido a la reducción del Dicromato en sales de cromo por el formol. (Kiernan 1990; Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2008)

Usos: La fijación con Helly's no debe realizarse por más de 12-24 horas. Además es muy importante eliminar todo el dicromato antes de la deshidratación, para eliminar los depósitos de mercurio antes de la tinción. (Kiernan 1990; Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2008)

Es recomendado para fijar médula ósea, tejidos hematopoyéticos y muestras-biopsias de discos intercalares. (Tomasi 2008; Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2008)

El líquido de Helly's también fija con buenos resultados elementos citoplasmáticos como mitocondrias y gránulos de secreción (lisosomas), así como las células de los órganos endocrinos (hipófisis, tiroides). (Kiernan 1990; Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2008)

La fijación vuelve los tejidos difícilmente teñibles, a excepción de las mitocondrias. Se recomienda cada 4 ó 5 días extraer un fragmento, lavarlo con agua corriente e

incluirlo en parafina. (Jaulmes *et al.* 1972; Kiernan 1990; Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2008)

Ventajas: Es recomendado para fijar médula ósea, tejidos hematopoyéticos, muestras-biopsias de discos intercalares, mitocondrias, gránulos de secreción (lisosomas), así como células de órganos endocrinos (hipófisis, tiroides). (Kiernan 1990, Tomasi 2008; Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2008)

Desventajas: La fijación con Helly's ocasiona dificultad para la tinción de los tejidos. (Jaulmes *et al.* 1972; Kiernan 1990; Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2008).

SHAUDINN'S

Características: Es una mezcla formada por:

- Agua destilada= 50 ml
- Cloruro de Mercurio (HgCl₂)= 3.5 g
- Etanol Absoluto (C₂H₆O)= 25 ml

(Lynne 2001)

Usos: Este fijador es usado ampliamente en protozoarios, es muy útil en preparaciones permanentes de especímenes intestinales, tales como amibas y protozoarios con flagelos. (Kiernan 1990; Lynne 2001; Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2008)

El fluido de Shaudinn también está diseñado para ser utilizado con muestras de heces frescas o muestras de la superficie de la mucosa intestinal. (Lynne 2001)

También es utilizado para conservar materia fecal reciente o material recuperado del revestimiento de la mucosa intestinal. (Castro 2006; Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2008)

Ventajas: Proporciona una excelente conservación de los trofozoitos y quistes de protozoarios, por lo que es un excelente fijador para frotis preparados a partir de muestras fecales frescas o muestras de las superficies de la mucosa intestinal. (Castro 2006; Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2008)

Desventajas: Tiene pocas cualidades adhesivas con algunas muestras líquidas o mucoides. Contiene sales de cloruro de mercurio, por lo que su eliminación puede ser problemática. (Lynne 2001; Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2008)

FIJADORES DE CROMATO

Características: Hay una variación entre los nombres atribuidos a las fórmulas de fijadores de dicromato pero no en las propias fórmulas. Entre los fijadores más utilizados con cromo tenemos las mezclas de Orth y la Möller. (Lillie *et al.* 1976 Bancroft *et al.* 2008)

Las sales de cromo en agua forman complejos Cr-o-Cr con gran afinidad por los grupos –COOH y –OH de las proteínas, apareciendo así complejos entre moléculas vecinas de proteínas. Esto significa ruptura de los enlaces salinos internos de la proteína, aumentando la disponibilidad de grupos básicos reactivos, y con ella la acidofilia durante la tinción. (Mathew *et al.* 1998; Martínez *et al.* 2008)

Usos: Son recomendados para la demostración de organelos como mitocondria, aparato de Golgi, figuras mitóticas, tejidos que contienen coloides y eritrocitos. (Lillie *et al.* 1976; Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2008)

La fijación de piezas ordinarias en soluciones a base de cromato requiere de 24 a 48 horas. (Lillie *et al.* 1976; Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2008)

Ventajas: Los fijadores que contienen cromato tienden a conservar los fosfolípidos en los cortes en parafina; a consecuencia de fenómenos de oxidación (cromación), son menos solubles en las soluciones ordinarias de deshidratación y aclaramiento. (Mathew *et al.* 1998; Martínez *et al.* 2008)

Desventajas: Penetran lentamente a los tejidos, por lo anterior los cortes no deben tener más de 2 a 3 mm de espesor. (Mathew *et al.* 1998; Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2008)

Después de la fijación con soluciones a base de cromato, todos los tejidos deben lavarse durante una hora (cuando menos) y, a continuación, ser transferidos a 70% de etanol. Un lavado deficiente del tejido después de la fijación puede causar pigmentos que precipitan. (Mathew *et al.* 1998; Bancroft *et al.* 2008)

Produce una contractura excesiva cuando los tejidos se procesan mediante inclusión con bloques de parafina. (Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.*, 2008).

Las soluciones de cromato con formol se oscurecen con el tiempo, por su acidez. Una fijación prolongada en soluciones de cromato tienden a blanquear todos los pigmentos tisulares, por ejemplo la melanina, por fenómenos de oxidación. (Bancroft *et al.* 2008).

En general se conserva mal el glucógeno; de hecho, los fijadores a base de sales de cromato son considerados contraindicados para los carbohidratos. (Mathew *et al.* 1998; Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2008)

LÍQUIDO DE MÖLLER

Características: Es una mezcla formada por:

- Dicromato Potásico ($K_2Cr_2O_7$)= 2.5 g
- Sulfato de Sodio (Na_2SO_4)= 1 g
- Agua Destilada= 100 ml

Es una mezcla estable que puede durar meses, siempre y cuando no se mezcle con formalina. (Bancroft *et al.* 2008)

Usos: Puede emplearse para teñir células enterocromafines o pigmentos que contienen hierro. Además es recomendado para observar mitocondrias y adipocitos (Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2008)

Ventajas: Las muestras fijadas con Möller permiten identificar más fácilmente a las células enterocromafines del intestino. Además permite coloraciones como Hematoxilina de Regaud, Scharlach y Sudán III (Jaulmes *et al.* 1972; Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2008)

Desventajas: Los tejidos requieren varios días para fijarse. Es similar al de Orth pero las muestras se endurecen más rápidamente y adquiere una consistencia más dura al final (Jaulmes *et al.* 1972; Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2008)

SOLUCIÓN DE ORTH

Características: Es una mezcla formada por:

- Dicromato Potásico ($K_2Cr_2O_7$)= 2.5 g
- Sulfato de Sodio (Na_2SO_4)= 1 g
- Agua Destilada= 100 ml
- Formol al 37 %= 10 ml

El formol, se añade inmediatamente antes del uso de la solución fijadora (Bancroft *et al.* 2008)

Usos: La fijación requiere entre 36 y 72 horas. Es ampliamente utilizado para el trabajo de rutina. Es igual al formol para el estudio o principios de los procesos degenerativos y necrosis. Las células Cromafines toman un característico tono marrón y su basofilia está bien con el líquido de Orth. La mielina se conserva bien, y la contracción pericelular visto sobre las células piramidales después del uso de la formalina es evitada. (Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2008)

Ventajas: Permite una adecuada fijación de células cormafines, mielina, además evita la contracción pericelular. (Jaulmes *et al.* 1972; Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2008)

Desventajas: Las muestras después de fijarse necesitan un lavado excesivo de 8-10 horas en agua que circule (agua corriente). (Sampecho 1952; Jaulmes *et al.* 1972; Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2008)

III. FIJADORES DE RECIENTE CREACIÓN

Son fijadores que se han desarrollado en los últimos años y que ofrecen ventajas, como el poder preservar las muestras para que sean utilizadas tanto para estudios histológicos como para estudios de biología molecular. (Delfour *et al.* 2006; Braun *et al.*, 2011; Shibutani *et al.* 2000; FineFIX The New Formalin-Free Fixative For Optimal Morphology and Molecular Analysis. URL: http://bmskorea.co.kr/bms_email/13-0110/finefix.pdf, HOPE-Fixation. URL: <http://www.hope-fixation.com/>; RCL2®, Formalin-free tissue fixative; URL: http://www.alphelys.com/alph01/prod/rcl2/us/rcl2_histo.php)

Entre los fijadores de reciente creación podemos mencionar:

- Methacarn
- FineFIX
- HOPE
- RCL2

METHACARN

Características: Es una mezcla formada por:

- 60 % de Metanol (100 %)
- 30 % de Cloroformo
- 10 % de Acido Acético

El Methacarn es un disolvente orgánico que causa enlaces cruzados que ayuda a mantener la morfología del tejido, la preservación de DNA y RNA y la integridad de las proteínas. (Shibutani *et al.* 2000; Delfour *et al.* 2006; Brancoft *et al.* 2008)

Se cree que el Methacarn causa la precipitación y la inactivación de la RNAasa del tejido endógeno. (Shibutani *et al.* 2000; Delfour *et al.* 2006; Brancoft *et al.* 2008)

Usos: Methacarn ha demostrado ser un fijador muy valioso porque preserva la morfología del tejido y además permite que se realicen diversos estudios inmunohistoquímicos. (Shibutani *et al.* 2000; Delfour *et al.* 2006; Brancoft *et al.* 2008)

Se ha utilizado para extraer DNA y RNA con una excelente calidad, conservándolos en condiciones adecuadas para análisis durante varios meses y permitiendo la aplicación de técnicas como un análisis mediante PCR. (Shibutani *et al.* 2000; Delfour *et al.* 2006; Brancoft *et al.* 2008)

Ventajas: Preserva muy bien las muestras de tejido, tanto morfológicamente así como las características químicas y estructurales que permiten la aplicación de técnicas de inmunotinción e histoquímica, esto aún después de varios meses de haberse fijado el tejido. (Shibutani *et al.* 2000; Delfour *et al.* 2006)

Permite la extracción de DNA y RNA con una calidad alta, al tiempo que los conserva por varios meses. Además las muestras de DNA y RNA pueden ser utilizadas para la aplicación de técnicas como el caso de análisis mediante PCR. (Shibutani *et al.* 2000; Delfour *et al.* 2006; Zanini *et al.* 2012)

Methacarn fijo-PET puede ser particularmente adecuado para el análisis de los acontecimientos moleculares en el nivel del mRNA para diversas poblaciones celulares (Shibutani *et al.* 2000; Delfour *et al.* 2006; Brancoft *et al.* 2008; Zanini *et al.* 2012).

Teniendo en cuenta sus ventajas para la detección inmunohistoquímica de proteína, el tejido después de la incrustación-methacarn de fijación debe ser recomendado como un valioso enfoque para la aplicación rutinaria, posiblemente en combinación con inmuno-LCM, un método recientemente desarrollado método que permite el análisis de ARNm de poblaciones de células inmunofenotípicamente definidos (Fend *et al.* 1999, Mitchel *et al.* 1985 ; Puchtler *et al.* 1970, Shibutani *et al.* 2000; Delfour *et al.* 2006; Brancoft *et al.* 2008; Zanini *et al.* 2012).

Desventajas: El fijador de Methacarn ha presentado problemas durante la “deshidratación” cuando se utilizan aparatos automatizados para procesamiento

histológico como es el caso del “*Thermo Excelsior tissue processor*” (Italscientifica, Italy) y esto es ocasionado por sus componentes (metanol, cloroformo); lo anterior puede ser subsanado realizando ajustes en los alcoholes utilizados durante la deshidratación. (Zanini *et al.* 2012)

El uso de methacarn también está limitado por la toxicidad potencial de sus componentes. (Fend *et al.* 1999; Mitchell *et al.* 1985; Shibutani *et al.* 2000; Delfour *et al.* 2006; Brancoft *et al.* 2008; Zanini *et al.* 2012)

FineFIX

Características: La literatura no menciona los componentes de la fórmula, ya que es una mezcla patentada, solamente menciona que para utilizarse debe diluirse previamente en etanol (Artz *et al.* 2011; FineFIX The New Formalin-Free Fixative For Optimal Morphology and Molecular Analysis. URL: http://bmskorea.co.kr/bms_email/13-0110/finefix.pdf)

Usos: La concentración de etanol en la solución FineFIX es de aproximadamente 70%. Esta concentración es buena para una muestra histológica y para permitir la recuperación óptima de DNA/RNA y proteínas, las cuales pueden ser utilizadas para diversos análisis moleculares (PCR, secuenciación, entre otros). Es un reactivo fijador que preserva en condiciones excelentes el DNA y el RNA, aún cuando las muestras sean muy pequeñas. (Artz *et al.* 2011)

Ventajas: Supera los inconvenientes que comúnmente están asociados con el uso de fijadores con etanol como son: contracción del tejido, vacuolización y núcleos picnóticos (Artz *et al.* 2011; FineFIX The New Formalin-Free Fixative For Optimal Morphology and Molecular Analysis. URL: http://bmskorea.co.kr/bms_email/13-0110/finefix.pdf)

FineFIX también proporciona una conservación óptima de los antígenos tisulares, la morfología nuclear y citoplasmática, además reduce la lisis de los eritrocitos y en general preserva muy bien las membranas citoplasmáticas (Artz *et al.* 2011; FineFIX The New Formalin-Free Fixative For Optimal Morphology and Molecular Analysis. URL: http://bmskorea.co.kr/bms_email/13-0110/finefix.pdf)

Ayuda a que las muestras se puedan diseccionar más cuidadosamente y así cortar bloques muy delgados o finos (Artz *et al.* 2011; FineFIX The New Formalin-Free Fixative For Optimal Morphology and Molecular Analysis. URL: http://bmskorea.co.kr/bms_email/13-0110/finefix.pdf)

Además realza la tonalidad de los colores en los tejidos teñidos, esto comparado con muestras que se fijaron con formol. (FineFIX The New Formalin-Free Fixative

For Optimal Morphology and Molecular Analysis. URL:
http://bmskorea.co.kr/bms_email/13-0110/finefix.pdf)

Desventajas: La literatura por el momento no menciona desventajas.

HOPE (Hepes-glutamic acid buffer mediated Organic solvent Protection Effect.)

Características: Hope es una combinación de aminoácidos y glucosa que están mezclados con un buffer (tampón) orgánico. Contiene acetona como agente deshidratador, esto permite desnaturalizar reversiblemente las proteínas (manteniendo su estructura), también preserva los ácidos nucleicos y los antígenos en general obteniéndose muy buenos resultados para estudios histopatológicos, inmunohistoquímicos, inmunohistológicos y de biología molecular (aislamiento de genes, hibridación *in situ*). Además contiene un máximo de 0.03% de NaN₃ (azida de sodio), lo que aumenta sus cualidades como fijador. (Braun *et al.* 2011; Alexei Gratchev. Methods. Info protocols we trust. Copyright 199-2006 URL:http://www.methods.info/Methods/Histology/HOPE_fixation.html; HOPE-Fixation. URL: <http://www.hope-fixation.com/>)

Usos: Las muestras fijadas con HOPE, pueden ser utilizadas para realizar diversas técnicas como: PCR; inmunohistoquímica; hibridación *in situ* de RNA y focalización de DNA. (Braun *et al.* 2011)

La técnica ® HOPE se utiliza exitosamente para la preparación de secciones (muestras) de tejidos embebidos (infiltrados) en parafina (Braun *et al.* 2011).

Ventajas: Las muestras de tejido no quedan “sobrefijadas” como en el caso del formol. Las muestras de tejido fijadas con la técnica HOPE permiten una mayor morfología y estudios retrospectivos sobre el nivel molecular. (Braun *et al.* 2011; Alexei Gratchev. Methods. Info protocols we trust. Copyright 199-2006 URL:http://www.methods.info/Methods/Histology/HOPE_fixation.html; HOPE-Fixation. URL: <http://www.hope-fixation.com/>)

En contraste con otros métodos de fijación HOPE ® mantiene las proteínas estructurales sin que se desnaturalicen completamente o realicen entrecruzamientos (cross-link) excesivos, también conserva mejor enzimas y

ácidos nucleicos. (Braun *et al.* 2011; Alexei Gratchev. Methods Info protocols we trust. Copyright 199-2006
URL:http://www.methods.info/Methods/Histology/HOPE_fixation.html;
Fixation. URL: <http://www.hope-fixation.com/>)

Permite la aplicación exitosa de la Inmunohistoquímica en tejido infiltrados de parafina sin ocasionar daños a los antígenos. (Braun *et al.* 2011; Alexei Gratchev. Methods. Info protocols we trust. Copyright 199-2006
URL:http://www.methods.info/Methods/Histology/HOPE_fixation.html;
Fixation. URL: <http://www.hope-fixation.com/>)

Proporciona excelentes resultados para hibridación *in situ* de RNA y DNA. También proporciona una excelente conservación de los ácidos nucleicos (RNA y DNA) para realizar pruebas como PCR y RT-PCR. (Braun *et al.* 2011; Alexei Gratchev. Methods. Info protocols we trust. Copyright 199-2006
URL:http://www.methods.info/Methods/Histology/HOPE_fixation.html;
Fixation. URL: <http://www.hope-fixation.com/>)

Las muestras fijadas con HOPE pueden mantenerse en el refrigerador (4°C) sin que sufran alteraciones por un tiempo muy largo. (Alexei 2006)

Desventajas: El protocolo de fijación con HOPE es un poco complejo y las muestras son más frágiles, por lo tanto más difíciles de manejar, ya que el punto de fusión con HOPE es menor que en el material de parafina. (Braun *et al.* 2011)
El manejo con HOPE debe ser cuidadoso porque a diferencia de otros reactivos fijadores permite el aislamiento de agentes etiológicos como: virus, priones, bacterias. (Braun *et al.* 2011)

Otra desventaja es que las muestras fijadas con HOPE deben mantenerse refrigeradas a 4°C. (Braun *et al.* 2011)

RCL2

Características: La literatura no menciona los componentes de la fórmula, ya que es una mezcla que se encuentra patentada (RCL2®, Formalin-free tissue fixative. URL: http://www.alphelys.com/alph01/prod/rcl2/us/rcl2_histo.php; Shibutani *et al.* 2000; Delfour *et al.* 2006; Zanini *et al.* 2012)

Usos: RCL2 conserva muy bien la integridad del DNA, permitiendo la amplificación exitosa y secuenciación de fragmentos grandes de DNA. (Shibutani *et al.* 2000; Delfour *et al.* 2006; Zanini *et al.* 2012)

RCL2 ® permite combinar estudios de histología y técnicas moleculares en una misma muestra, facilitando una investigación o un diagnóstico eficiente. RCL2 ® es un fijador de tejidos que permite obtener muestras de excelente calidad compatibles con las técnicas histológicas y moleculares, también permite el almacenamiento a temperatura ambiente. (RCL2®, Formalin-free tissue fixative. URL: http://www.alphelys.com/alph01/prod/rcl2/us/rcl2_histo.php; Shibutani *et al.* 2000; Delfour *et al.* 2006; Zanini *et al.* 2012)

Ventajas: RCL2 ® preserva excelentemente las estructuras y moléculas de las células y tejidos; así la morfología del tejido y la integridad del RNA se han conservado incluso después de 8 meses de almacenamiento. (RCL2®, Formalin-free tissue fixative. URL: http://www.alphelys.com/alph01/prod/rcl2/us/rcl2_histo.php; Shibutani *et al.*, 2000; Delfour *et al.* 2006; Zanini *et al.*, 2012)

La coloración de rutina de Hematoxilina y Eosina (H y E) muestra la morfología y colores similares a los obtenidos con los tejidos fijados con formalina. (Shibutani *et al.*, 2000; Delfour *et al.* 2006; Zanini *et al.*, 2012)

Las propiedades de fijación excepcionales de RCL2 ® le permiten evitar congelación. (Shibutani *et al.*, 2000; Delfour *et al.* 2006; Zanini *et al.*, 2012)

Los tejidos fijados con RCL2 ® se pueden almacenar a temperatura ambiente o a -20°C cuando se requiere una calidad “ultra” para diagnósticos o estudios

moleculares mediante RNA y DNA (Shibutani et al, 2000; Delfour *et al.* 2006; Zanini *et al.* 2012).

Los productos obtenidos mediante la técnica de PCR pueden ser secuenciados de manera correcta (Shibutani *et al.* 2000; Delfour *et al.* 2006; Zanini *et al.* 2012).

Los componentes no tienen riesgos potenciales de toxicidad. (RCL2®, Formalin-free tissue fixative: http://www.alphelys.com/alph01/prod/rcl2/us/rcl2_histo.php)

Desventajas: El fijador de RCL2 no puede utilizarse en todos los aparatos procesadores de tejidos, por ejemplo ha presentado problemas durante la “deshidratación” en aparatos automatizados como el “*Thermo Excelsior tissue processor*” (Italscientifica, Italy) y esto es ocasionado por sus componentes, aunque estos no se conocen por ser una formulación patentada. (Zanini *et al.* 2012)

ANÁLISIS DE RESULTADOS

El desarrollo y uso de los reactivos fijadores para tejidos, se incrementó a principios del siglo XX y fue con fines de preservar las muestras que serían procesadas “histológicamente” mediante infiltración de parafina (o resina) y con fines de realizar estudios histológicos o histopatológicos; por ello los reactivos fijadores que se desarrollaron en esa época solamente eran apreciados por la calidad de la conservación morfológica en las muestras, y en algunos casos por la preservación de elementos químicos apreciados en los tejidos como el caso de los lípidos y el glucógeno. Dentro de los reactivos fijadores que cumplen con esas funciones “generales” podemos mencionar algunos muy utilizados como: Formol, etanol, glutaraldehído, acetona, ácido acético, ácido pícrico, cloruro de mercurio y mezclas fijadoras como Bouin, Carnoy, Zenker, Helly’s, Shaudinn, Möller, Orth, entre otros. (Kiernan, 1990; Mathew 1998; Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2008; Cui 2011)

Existen algunos reactivos fijadores que además de preservar la morfología celular y estructural de los tejidos, tuvieron la característica de mantener las muestras en un estado tan correcto, que permiten la aplicación de técnicas histoquímicas o inmunohistoquímicas, entre los cuales se encuentran: formol, acetona, glutaraldehído. También se desarrollaron fijadores que permiten que las muestras sean trabajadas para su observación y estudio en microscopio electrónico como es el caso de: tetraóxido de osmio, etanol, glutaraldehído. (Kiernan, 1990; Mathew, 1998; Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2008; Cui 2011)

Sin embargo, todos estos reactivos fijadores, fueron diseñados únicamente para observar las muestras mediante microscopios fotónicos y/o electrónicos, y la calidad de fijación de los tejidos en cuestión no permite la aplicación de técnicas de biología molecular como es el caso del PCR, aislamiento y clonación de fragmentos de DNA y RNA e hibridación *in situ*, entre otras. (Kiernan, 1990; Mathew, 1998; Bancroft *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2008; Cui 2011)

A finales del siglo XX y principios del siglo XXI, surgen los “nuevos reactivos fijadores”, desarrollados con mayores exigencias de trabajo, que permiten estudios histológicos, histopatológicos, técnicas de histoquímica, inmunohistoquímica, inmunofluorescencia y aplicación de las técnicas de biología molecular como el caso de PCR, para realizar secuenciación y clonación de fragmentos de DNA e hibridación *in situ* entre otras (Shibutani *et al.*, 2000; Delfour *et al.* 2006; Zanini *et al.* 2012, Braun *et al.* 2011).

Entre los nuevos reactivos fijadores que permiten todo lo anterior tenemos: Methacarn, FineFIX, HOPE y RCL2. Sin embargo, los reactivos fijadores de nueva creación pueden presentar desventajas, entre las cuales se mencionan:

1. Methacarn.- Es muy tóxico por sus componentes, los cuales no se mencionan por ser una formulación patentada. No puede utilizarse en todos los aparatos procesadores de tejidos, presenta problemas durante la “deshidratación” en aparatos automatizados (“Thermo Excelsior tissue processor, Italscientifica, Italy). (Fend *et al.* 1999, Mitchell *et al.* 1985; Puchtler *et al.* 1970; Shibutani *et al.*, 2000; Delfour *et al.* 2006; Zanini *et al.* 2012, Braun *et al.* 2011)
2. HOPE.- El protocolo de fijación es muy complejo, además las muestras requieren mantenerse refrigeradas a 4°C después de ser fijadas. Las muestras fijadas permiten el aislamiento de agentes como virus, priones y bacterias, por ello las muestras deben manipularse con precaución para evitar diseminación de posibles agentes etiológicos. (Shibutani *et al.*, 2000; Delfour *et al.* 2006; Zanini *et al.* 2012, Braun *et al.* 2011, HOPE-Fixation. URL: <http://www.hope-fixation.com/>)
3. RCL2.- No puede utilizarse en todos los aparatos procesadores de tejidos, por ejemplo ha presentado problemas durante la “deshidratación” en aparatos automatizados como el “Thermo Excelsior tissue processor” (Italscientifica, Italy) y esto es ocasionado por sus componentes, aunque estos no se mencionan por ser una formulación patentada. (Shibutani *et al.*,

2000; Delfour *et al.* 2006; Zanini *et al.* 2012, Braun *et al.* 2011, RCL2®,
Formalin-free tissue fixative. 2011 URL:
http://www.alphelys.com/alph01/prod/rcl2/us/rcl2_histo.php)

Es importante resaltar que para el caso del fijador FineFIX, la literatura por el momento no menciona desventajas.

Las principales ventajas, desventajas y usos se resumen en las siguientes tablas (tablas 1, 2 y 3).

Tabla 1.**REACTIVOS FIJADORES SIMPLES**

Reactivo	Ventajas	Desventajas	Usos Recomendables
FORMOL	<ul style="list-style-type: none"> - Preparación sencilla fácil de conseguir. - Rápida penetración. - Precipita proteínas. - Fija lípidos complejos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Endurecimiento en largos periodos de almacenamiento. - Modifica las bases de ácidos nucleicos, afectando al DNA y RNA. 	<ul style="list-style-type: none"> - Es el Fijador más comúnmente utilizado. - Utilización en cadáveres frescos. - Para uso en histoquímica.
TETRAOXIDO DE OSMIO	<ul style="list-style-type: none"> - Ampliamente usado en tinción para Microscopia Electrónica de transmisión y de barrido. - Estabiliza las proteínas sin que pierdan su estructura. 	<ul style="list-style-type: none"> - Extremadamente tóxico (venenoso); tiñe la córnea humana, puede llevar a la ceguera. - Penetra y destruye plástico debe conservarse en vidrio. - Puede causar aglutinación de los núcleos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Agente de tinción en microscopia electrónica. - Tinción de membrana plasmática sobre todo fosfolípidos. - Tiñe lípidos para observación en microscopio óptico.
GLUTARALDEHIDO	<ul style="list-style-type: none"> - No desnaturaliza proteínas. - Útil para técnicas inmunohistoquímicas. 	<ul style="list-style-type: none"> - Lenta penetración. - Artefactos de fijación por largo periodo de conservación. 	<ul style="list-style-type: none"> - Fijador para uso histológico e histopatológico. - Para uso en inmunohistoquímica. - Uso en microscopio electrónico.
CLORURO DE MERCURIO	<ul style="list-style-type: none"> - Rápida penetración. - Precipita todas las proteínas. 	<ul style="list-style-type: none"> - Endurece mucho los tejidos. - Requiere de muestras muy delgadas para tener una buena fijación. 	<ul style="list-style-type: none"> - No se recomienda su uso solo, se utiliza en las denominadas mezclas mercuriales.
ACETONA	<ul style="list-style-type: none"> - Se recomienda para protocolos de "inmunofluorescencia directa", para detección de complejos inmunes. 	<ul style="list-style-type: none"> - Baja penetración. - Disuelve las grasas. - Ocasiona fragilidad de los tejidos en uso prolongado. 	<ul style="list-style-type: none"> - Fijador rápido para tejido cerebral. - Se recomienda utilizar en Criostato y técnicas de congelación. - Para ácidos nucleicos y protocolos de inmunofluorescencia.

Tabla 1.(CONTINUACIÓN)

REACTIVOS FIJADORES SIMPLES

Reactivo	Ventajas	Desventajas	Usos Recomendables
ETANOL	-Tiene una penetración inmediata.	- Puede ocasionar un endurecimiento excesivo del tejido. -No puede usarse con muchos fijadores metálicos.	-Puede utilizarse como fijador para procesamiento en muestras de microscopia electrónica. -Fija exitosamente los cromosomas.
ÁCIDO ACETICO	-Buena penetración. -Se puede combinar con cualquier otro fijador.	-Nunca se utiliza solo. -Precipita ácidos nucleicos y disuelve histonas.	- Se recomienda utilizar en combinación con otros agentes fijadores como las sales de mercurio, alcohol, etanol y formol
ÁCIDO PICRICO	-Inhibe los efectos de las enzimas. -Fija citoplasma facilitando coloraciones.	-Lenta penetración.	-Se utiliza en mezclas. - Permite la aplicación de técnicas tricrómicas. -

TABLA 2.**FIJADORES COMPUESTOS (MEZCLAS)**

Reactivo	Ventajas	Desventajas	Usos Recomendables
BOUIN	<ul style="list-style-type: none"> -Penetra rápidamente. -Buen fijador para estudio del glucógeno. 	<ul style="list-style-type: none"> -Puede encoger muestras grandes y volverlas duras y quebradizas en fijaciones que excedan las 24hr. 	<ul style="list-style-type: none"> - Para empleo en muestras donde se aplicarán técnicas de coloración tricrómicas. - Diagnóstico Topográfico. - Citología General. - Técnicas que requieran preservación de lípidos y grasas. - Descalcificación de hueso.
CARNOY	<ul style="list-style-type: none"> -Rápida penetración. -Buen fijador de glucógeno. -Buena fijación nuclear. 	<ul style="list-style-type: none"> -Encoje y endurece los tejidos. -Hemólisis de eritrocitos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Muestras de tejidos que requieran un inclusión rápida, como en el caso de biopsias. - Sistema nervioso - Glucógeno.
FLEMMING	<ul style="list-style-type: none"> -Se recomienda para conservación y tinción de cromosomas. 	<ul style="list-style-type: none"> -Lenta penetración, no penetra en muestras con más de 2mm de espesor. -La fijación no es uniforme en todas las capas celulares. 	<ul style="list-style-type: none"> - Buen fijador para microscopio electrónico - Recomendado para apreciar mielina en tejido nervioso.
ZENKER	<ul style="list-style-type: none"> - Permite apreciar estructuras morfológicas muy delicadas, como en el caso de los tejidos hematopoyéticos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Produce pigmentos de bicloruro de mercurio. 	<ul style="list-style-type: none"> - Órganos hematopoyéticos. - Métodos Tricrómicos.
HELLYS	<ul style="list-style-type: none"> - Fija bien tejidos delicados como tejidos hematopoyéticos, medula ósea, entre otros. 	<ul style="list-style-type: none"> -La fijación puede ocasionar dificultad para la tinción de los tejidos. 	<ul style="list-style-type: none"> -Muestras para apreciar citología ultraestructural, ya que permite apreciar orgánulos como mitocondrias y gránulos de secreción. -Órganos hematopoyéticos. - Discos intercalares. - Estructura y células de órganos endocrinos.

TABLA 2. (CONTINUACIÓN)

FIJADORES COMPUESTOS (MEZCLAS)

Reactivo	Ventajas	Desventajas	Usos Recomendables
SHAUDINN	<ul style="list-style-type: none"> - Conserva bien estructuras delicadas como frotis de mucosa intestinal. - Permite buena conservación de trofozoitos y protozoarios. 	<ul style="list-style-type: none"> - No permite buena fijación de muestras líquidas o mucoides. -La eliminación de las sales de mercurio debe realizarse conforme a las normas oficiales vigentes. 	<ul style="list-style-type: none"> - Para muestras de mucosa intestinal. - Puede utilizarse como fijador para protozoarios.
FIJADORES DE CROMATO	<ul style="list-style-type: none"> - Conservan los fosfolípidos en muestras procesadas mediante inclusión en parafina. 	<ul style="list-style-type: none"> - Penetran lentamente los tejidos. - Pueden producir una contractura excesiva en los tejidos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Para muestras de ultraestructura celular, ya que se observan organelos como mitocondria, aparato de Golgi, y figuras mitóticas.
MÖLLER	<ul style="list-style-type: none"> -Permite identificar células enterocromafines. - Permite coloraciones como Hematoxilina de Regaud, Scharlach y Sudán III. 	<ul style="list-style-type: none"> - Los tiempos de fijación son variables en los diferentes tejidos. -Endurece más rápido las muestras con consistencia más dura al final. 	<ul style="list-style-type: none"> -Para teñir células enterocromafines o pigmentos que contiene hierro. -Para observar mitocondrias y adipocitos. - Muestras que requieran coloraciones como: Hematoxilina de Regaud, Scharlach y Sudán III.
ORTH	<ul style="list-style-type: none"> - Permite una adecuada fijación de las células evitando la contracción pericelular. 	<ul style="list-style-type: none"> -Las muestras después de fijarse necesitan un lavado excesivo de 8-10 horas en agua que circule (agua corriente) 	<ul style="list-style-type: none"> -Se utiliza para estudio de procesos degenerativos y necrosis. - Se recomienda para observación de células cromafines, mielina, entre otros.

TABLA 3.
FIJADORES DE RECIENTE CREACIÓN.

REACTIVO	VENTAJAS	DESVENTAJAS	USOS RECOMENDABLES
METHACARN	<ul style="list-style-type: none"> - Preserva bien la morfología y estructura celular. - Permiten la extracción de DNA y RNA de alta calidad. 	<ul style="list-style-type: none"> - Es muy tóxico por sus componentes. - No puede utilizarse en todos los aparatos automatizados para procesar tejidos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Permite aplicación de técnicas para biología molecular como es el caso de PCR. - Permite realizar estudios de inmunohistoquímica.
FineFIX	<ul style="list-style-type: none"> - Conserva muy bien la morfología celular. - Reduce la lisis celular. - Realza la tonalidad de los colores en los tejidos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Por el momento, la literatura no menciona desventajas. 	<ul style="list-style-type: none"> - Utilización de antígenos tisulares en técnicas inmunohistoquímicas. - Recuperación óptima de DNA y RNA para análisis moleculares.
HOPE	<ul style="list-style-type: none"> - Preserva bien la estructura celular. - Permite estudios retrospectivos a nivel molecular. - Conserva muy bien los ácidos nucleicos. 	<ul style="list-style-type: none"> - El protocolo de fijación es complejo. - Requiere mantener las muestras refrigeradas (4°C). - 	<ul style="list-style-type: none"> - Permite aislamiento de agentes como virus, priones y bacterias. - Se recomienda para realizar técnicas como PCR, hibridación in situ de RNA y localización de DNA.
RCL2	<ul style="list-style-type: none"> - Permite conservar las muestras a temperatura ambiente. - Preserva muy bien las estructuras y moléculas de las células y tejidos. 	<ul style="list-style-type: none"> - No puede utilizarse en todos los aparatos automatizados para procesar tejidos 	<ul style="list-style-type: none"> - Para trabajar muestras de tejidos que requieran técnicas de inmunohistoquímica y/o biología molecular.

CONCLUSIONES

Los reactivos fijadores desarrollados en el siglo XX, permiten obtener tejidos con una calidad que es recomendada básicamente para estudios histológicos o histopatológicos, en donde se requiere únicamente la apreciación de la morfología de las células y sustancias intercelulares.

Entre los reactivos anteriores más empleados son: formol, etanol, glutaraldehído, acetona, ácido acético, ácido pícrico, cloruro de mercurio y mezclas fijadoras como Bouin, Carnoy, Zenker, Helly's, Shaudinn, Möller, Orth, entre otros.

Existen algunos reactivos fijadores como el formol, acetona, y glutaraldehído, pueden recomendarse para la aplicación de técnicas histoquímicas o inmunohistoquímicas.

Existen reactivos fijadores que permiten que las muestras sean trabajadas para su observación y estudio en microscopio electrónico tal es el caso de: tetraóxido de osmio, etanol, glutaraldehído.

Los reactivos fijadores anteriores deben recomendarse para utilizarse en tejidos que serán estudiados con fines histológicos e histopatológicos y preferentemente mediante el uso de microscopía fotónica y en algunos casos electrónica.

Los reactivos fijadores de reciente creación desarrollados a finales del siglo XX y principios del siglo XXI, permiten estudios histológicos, histopatológicos y aplicación de técnicas de biología molecular (PCR, secuenciación de DNA e hibridación *in situ*).

Los reactivos fijadores de nueva creación pueden presentar desventajas, por lo que es muy importante que antes de utilizarlos se realice una planeación de los posibles usos analizando ventajas, desventajas, precauciones para su uso y su precio, ya que los "reactivos fijadores nuevos" pueden incrementar los costos de la investigación o estudio en cuestión.

BIBLIOGRAFÍA

1. Arun K., Archana S. **“Chromosome Techniques. Theory and Practice”**. Third edition. Ed. Butterworth & Co. USA Boston 1980.
2. Artz L, Kothmaier H, Quehenberger F, Halbwedl I, Wagner K, Maierhofer T, Popper H. **“Evaluation of formalin-free tissue for RNA and microRNA studies”**. ELSEVIER. Volumen 91, Issue 2, October 2001, Pages 490-495.
3. Bancroft J, Gamble M. **“Theory and Practice of Histological Techniques”**. Ed. Churchill Livingstone Elsevier Sixth Edition. China 2008.
4. Banks, W.J. **“Histología Veterinaria y Aplicada”**. 2ª. Ed. Manual Moderno. México. 1996.
5. Berlyn G., Mikscke J., **“Botanical Microthique and Cytochemistry”** Second Printing. Ed. The Iowa State University Press. 1977.
6. Braun M, Menon R, Nikolov P, Kirsten R, Petersen K, Schilling D, Schott C, Gündish S, Fend F, Becker KF, Perner S. **The HOPE fixation technique-a promising alternative to common prostate cancer biobanking approaches**. BMC Cancer. 2011; 11: 511. Published online 2011 December 7 PubMed
7. Castro A, Guerrero O. “Técnicas de Diagnóstico Parasitológico” Editorial de la Universidad de Costa Rica. Segunda Edición 2006 Costa Rica 2006.
8. Cook D. **“Cellular Pathology an Introduction to techniques and applications”**. Ed. Scion Cronwell Press. UK 2006
9. Cui D. **“Histología con correlaciones funcionales y clínicas”**. Wolters Kluwer Health, Lippincot Williams & Wilkins. Barcelona, España 2011.
10. Delfour C, Roger P, Bret C, Berthe M, Rochaix P, Kalfa N, Raynaud P, Bibeau F, Maudelonde T, Boulle N. RCL2 a new Fixative, preserves Morphology and Nucleic Acid Integrity in Paraffin- Embedded Breast Carcinoma and Microdissected Breast Tumor Cells. NCBI Journal May 2006.
11. Elvers B, Hawkins S y otros; Ullman´s **Encyclopedia of Industrial Chemistry; Volumen 1**; Quinta edición completamente revisada; Editorial VCH; New York, U.S.A.; 1989

12. Estrada E, Peralta L, Rivas P. **“Manual de Técnicas Histológicas”** Ed. AGT EDITOR, S.A. México 1982.
13. Fend F, Emmer B, Chuaqui R, Cole K, Lee J, Liotta L, Raffeld M. “Immunol-CM: laser capture microdissection of immunostained frozen sections for mRNA analysis”. *Am J Pathol* 1999 154:61-66.
14. Graeme P, Jerome P. **“Botanical Microtechnique and Cytochemistry”**. Ed. The Iowa State University Press. Second printing 1977. Iowa 1976.
15. Jaulmes Ch., Jude A., Querangal J., Essarts D., Delga J. **“Práctica de Laboratorio”** Segunda edición. Ed. Toray-Masson. Barcelona 1972.
16. Lillie M., Harold M., Fullmer. **“Histopathological Technic and Practical Histochemistry”**. Fourth edition. USA 1976
17. Luna I.G. “Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology” 3ª Editorial EUA 1968.
18. Lynne S. **“Diagnostic Medical Parasitology”** Ed. ASM PRESS Fourth Edition USA 2001.
19. Kiernan J., **“Histological and Histochemical Methods Theory and Practice”**. Second Edition. Ed. Pergamon Press. Great Britain 1990.
20. Martínez R, Gragera R, Plumet J, Martínez R, Capilla J. **“Fundamentos Teóricos y Prácticos de la Histoquímica”**. Editorial Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid 2008
21. Mathew J., Stanley S., Leslie D., Peter., Martin J. **“Métodos de Laboratorio”** Segunda edición. Ed. Interamericana. México 1998.
22. McMURRY J. **“Química Orgánica”** Ed. Internacional Thomson Editores. México 2001.
23. Mitchel D, Ibrahim S, Gusterson B. “Improved immunohistochemical localization of tissue antigens using modified methacarn fixation”. *Journal Histochem Cytochem* 1985 33:491-495.
24. Mora Angeles Claudia, Chávez Álvarez Benjamín Emmanuel, Mercado Márquez Crisóforo, López Farías Hugo César, Adams Vázquez Olivia y

- Cornejo Cortés Miguel Angel. **“Manual para la materia de Biología del Desarrollo e Histología Veterinaria”**. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, 2010.
25. Morel G, Raccurt N. **“PCR/RT_PCR in situ Light and Electron Microscopy”** Ed. CRC PRESS. USA 2003.
26. Ojeda S. **“Métodos de Microscopia Electrónica de Barrido en Biología”**. Editorial Universidad de Cantabria 1997.
27. Puchtler H, Waldrop FS, Meloan SN, Terry MS, Conner HM. **“Methacarn (Methanol-Carnoy) fixation”**. Practical and Theoretical Considerations. *Histochemie* 1970 21:97-116
- Ojeda S. **“Métodos de Microscopía Electrónica de Barrido en Biología”** Imprime Universidad de Cantabria 1997.
28. Sampecho J. **“Técnica Micrográfica y Organografía Microscópica”**. Editor Francisco Mendez Oteo. Librería de Medicina. Octava Edición. México DF 1952.
29. Shibutani M, Uneyama C, Miyazaki K, Toyoda K, Hirose M. Methacarn fixation: a novel tool for analysis of gene expressions in paraffin-embedded tissue specimens. *Lab Invest.* 2000;80:199–208. [PubMed]
30. Torres F. **“Manual de Técnicas en Histología y Anatomía Patológica”** Ed. Ariel Practicum. España 2002
31. William J. **“The Art Examining and Interpreting Histologic Preparations”**. Ed. Parthenon Publishing Group. New York London 2001
32. Zanini C, Gerbaudo E, Ercole E, Vendramin A, Forni M. **“Evaluation of two commercial and three made fixatives for the substitution of formalin: a formaldehyde-free laboratory is possible”**. *Environmental Health* 2012, 11:59

CIBERGRAFÍA

1. Alexei Gratchev. *Methods. Info protocols we trust*. Copyright 199-2006
URL: http://www.methods.info/Methods/Histology/HOPE_fixation.html

2. Alzola R. “*Técnicas histológicas*”. Curso de Histología, Embriología y Teratología, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, 2001. Aviable from: URL: <http://www.vet.unicen.edu.ar> .
3. Aimale M.A. y Gatti Chr. J. “*Introducción a las técnicas histológicas*”, Cátedra de Anatómo-Histología, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur, San Juan 670 C.P.B8000ICN. 2004. Aviable from: URL: <http://www.anatomohistologia.uns.edu>.
4. Carnoy’s Solution. 2013 URL: http://en.wikipedia.org/wiki/Carnoy's_solution
5. Fijador de Zenker. 2012
URL:http://translate.google.com.mx/translate?hl=es&langpair=en%7Ces&u=http://en.wikipedia.org/wiki/Zenker's_fixative
6. Fijación de Muestras Histológicas. 2009
URL: <http://www.educacionhistotecnologiadefijaciondos.blogspot.mx/>
7. FineFIX The New Formalin-Free Fixative For Optimal Morphologyand Molecular Analysis. 2003 URL: http://bmskorea.co.kr/bms_email/13-0110/finefix.pdf
8. Hoja de seguridad Acetona.
URL:<http://www.quimica.unam.mx/IMG/pdf/4acetona.pdf>
9. HOPE-Fixation. URL: <http://www.hope-fixation.com/>
10. RCL2®, Formalin-free tissue fixative. 2011
URL: http://www.alphelys.com/alph01/prod/rcl2/us/rcl2_histo.php
11. Tomasi Victor Hugo. Mezclas Fijadoras. 2008
URL: <http://educacionhistotecnologiamezclasfijado.blogspot.mx/>
12. Tetraóxido de osmio. 2013
URL:http://es.wikipedia.org/wiki/Tetr%C3%B3xido_de_osmio
12. Visita guiada por las Técnicas Histológicas. Fijadores. 2009
URL: <http://webs.uvigo.es/mmegias/6-tecnicas/2-fijadores.php>